

Université de Montréal

Identification des métalloprotéases de la matrice extracellulaire synthétisées et sécrétées
par des cellules dérivées de la lignée MDCK, les cellules MSV-MDCK-INV aux
propriétés tumorales et invasives

par

Zeinab Daher

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise es sciences* en Biochimie

Décembre 2004

© Zeinab Daher, 2004



W

4

U58

2005

v.057

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Identification des métalloprotéases de la matrice extracellulaire synthétisées et sécrétées
par des cellules dérivées de la lignée MDCK, les cellules MSV-MDCK-INV aux
propriétés tumorales et invasives

présenté par :
Zeinab Daher

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Gerardo Ferbeyre, président-rapporteur
Dr Josette Noël, directeur de recherche
Dr Jean-Yves Lapointe, membre du jury

RÉSUMÉ

Les métalloprotéases (MMPs) font partie d'une grande famille d'enzymes présentes dans presque toutes les cellules, capables de dégrader les composantes de la matrice extracellulaire (ECM). Un lien est établi entre les MMPs et les cellules tumorales. En effet une sur-expression et/ou une activation non-contrôlée des métalloprotéases permet aux cellules tumorales possédant une capacité motile de quitter le foyer initial et de former des métastases. Nous avons démontré que les cellules MDCK transformées par le virus du sarcome de Moloney (MSV) et sélectionnées pour leur caractère invasif (MSV-MDCK-INV) expriment le récepteur c-Met hautement phosphorylé. L'autophosphorylation du récepteur induite par le ligand HGF (*hepatocytes growth factor*), sécrété par ces cellules, module la motilité des cellules MSV-MDCK-INV et la formation de nombreux pseudopodes. L'objectif du présent projet de recherche était de déterminer si les cellules invasives synthétisent et sécrètent des MMPs en quantité différente des cellules MDCK et MSV-MDCK, de les identifier et de déterminer leurs rôles dans la motilité cellulaire. Nous avons démontré, par la technique d'immunobuvardage de type *western*, que le niveau d'expression de la MMP2 et 9 n'est pas différent entre les cellules MSV-MDCK-INV et les cellules parentales MDCK et MSV-MDCK. Nos résultats de zymmographie montrent que l'activité de la MMP2 des cellules MSV-MDCK-INV est négligeable et que l'activité de la MMP9 de ces cellules est inférieure aux cellules MDCK. Ceci est dû en partie à la voie de signalisation PKC. En effet, contrairement aux cellules MDCK, le TPA ne stimule pas l'expression ni la sécrétion de la MMP9 dans les cellules MSV-MDCK-INV.

Finalement, le fait que l'ilomastat, un inhibiteur des MMPs, diminue en partie la motilité des cellules MSV-MDCK-INV suggère qu'une ou plusieurs MMPs jouent un rôle dans la motilité des cellules MSV-MDCK-INV. Les MMPs impliquées demeurent à être identifiées et caractérisées.

Mots clés: HGF, c-Met, MMP2, MMP9, TPA, PKC, Ilomastat

SUMMARY

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a large family of enzymes present in almost all cells, known to degrade extracellular matrix proteins (ECM). A link was established between MMPs and tumoral cells. Indeed an uncontrolled expression and/or activation of metalloproteinases allow tumoral cells having a motile capacity to form metastasis. We showed that MDCK cells transformed by Moloney sarcome virus (MSV) and selected for their invasive character (MSV-MDCK-INV) express a highly phosphorylated c-Met receptor. The autophosphorylation of this receptor via an autocrine HGF loop modulates motility of these cells and formation of multiple pseudopodes. The aims of the present study were first to determine if invasive cells (INV) synthesize and secrete more MMPs than MDCK and MSV-MDCK, second to identify those MMPs and to determine their roles in motility. We showed by Western Blotting, and by zymography that the expression of MMP2 and 9 is not different between MSV-MDCK-INV cells and MDCK and MSV-MDCK cells. Our zymography results show that the activity of MMP2 in MSV-MDCK-INV cells is negligible and the activity of MMP9 in MSV-MDCK-INV cells is lower than in MDCK cells. A defect in PKC signalling pathway or expression of a different type of PKC isotype could explain these results. Indeed, in contrast to MDCK cells, TPA does not stimulate the expression nor the secretion of the MMP9 in MSV-MDCK-INV cells. Finally, the large-scale inhibitor of MMPs, ilomastat decreases the motility of MSV-MDCK-INV cells suggesting that one or more MMPs play a role in the motility of MSV-MDCK-INV cells. These specific MMPs remain to be identified and characterized.

Key words: HGF, c-Met, MMP2, MMP9, TPA, PKC, Ilomastat

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iv
SUMMARY.....	v
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	xiv
DÉDICACE.....	xvii
 REMERCIEMENTS	 xviii
 CHAPITRE I : INTRODUCTION	
 I.1 LE CANCER.....	 20
I.1.1 Définition.....	20
I.1.2 Classification des cancers	21
I.1.3 Évènement génétique du cancer	21
I.1.3.1 Les proto-oncogènes et les voies de la stimulation	22
I.1.3.2 Les anti-oncogènes et les voies de l'inhibition.....	23
I.1.4 Les nouvelles propriétés cellulaires.....	24
I.1.4.1 L'angiogenèse.....	24
I.1.4.2 La perte de cohésion tissulaire.....	24
I.1.4.3 Les molécules d'adhésion.....	25
I.1.4.4 Les protéases.....	25
I.1.4.5 La mobilité cellulaire.....	25
I.1.4.6 Le transport hématogène	26
I.1.4.7 L'extravasation	26
 I.2 MOTILITÉ ET INVASION CELLULAIRE.....	 27

I.3 LES MÉTALLOPROTÉASES (MMPs)	27
I.3.1 Classification	28
I.3.2 Structure	31
I.3.3 Activation des MMPs	33
I.3.3.1 Activation extracellulaire des MMPs par des proteinases « non-MMPs »	34
I.3.3.2 Activation extracellulaire des MMPs par d'autres MMPs	35
I.3.3.3 Activation intracellulaire des MMPs par la furine	35
I.3.3.4 Activation des MMPs par les MT-MMPs	35
I.3.4 Rôle des métalloprotéases	37
I.3.4.1 Rôle physiologique	37
I.3.4.1.1 des collagénases	37
I.3.4.1.2 des stromélysines	38
I.3.4.1.3 des gélatinases	39
I.3.4.2 Rôle des MMPs dans le cancer	39
I.3.4.2.1 Perte d'adhérence	40
I.3.4.2.2 Invasion	41
I.3.4.2.3 Prolifération	41
I.3.4.2.4 Angiogenèse	41
I.3.5 Régulation de l'activité des MMPs	42
I.3.5.1 Régulation de l'expression	42
I.3.5.2 Régulation par les inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs)	43
I.4 LE HGF ET SON RÉCEPTEUR (c-MET)	45
I.4.1 Le HGF/SF	45
I.4.2 Le récepteur HGF-R (c-Met)	45
I.4.3 Implication du HGF et son récepteur dans le cancer	48
I.5 TRANSFORMATION CELLULAIRE	48
I.5.1 Les cellules MSV-MDCK-INV	48

I.5.1.1 Transformation des cellules par le virus du sarcome de Moloney	48
I.5.1.2 Sélection d'une population invasive.....	49
I.5.1.3 Caractéristiques des cellules MSV-MDCK-INV	50
I.6 BUT DE L'ÉTUDE.....	52
 CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES	
II.1 ANTICORPS ET RÉACTIFS	55
II.1.1 Réactifs de culture cellulaire	55
II.1.2 Anticorps primaires et recombinants.....	55
II.1.3 Anticorps secondaires	55
II.1.4 Autres	55
II.2 CULTURE CELLULAIRE	56
II.3 IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN	56
II.3.1 Préparation des lysats cellulaires	56
II.3.2 Dosage des protéines	57
II.3.3 Séparation des protéines sur un gel de polyacrylamide	58
II.3.4 Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose	59
II.3.5 Révélation des protéines au rouge Ponceau	59
II.3.6 Immunodétection.....	59
II.3.6.1 Western blot anti-phospho c-Met.....	60
II.3.6.2 Western blot anti MMP2, anti-MMP9 et anti-TIMP2.....	60
II.3.6.3 Western blot anti-FAK.....	60
II.4 DÉCAPAGE (<i>STRIPPING</i>) DES ANTICORPS	61
II.5 ZYMMOGRAPHIE	61
II.6 TECHNIQUE DE LA PLAIE.....	62
 CHAPITRE III : RÉSULTATS	65
III.1 Niveau d'expression de la MMP2 dans les trois lignées cellulaires	65

III.1.1 La bande de haut poids moléculaire (~105kDa) ne correspond pas au complexe MMP2/TIMP2.....	66
III.2 L'expression de la MMP9 est équivalente dans les trois lignées cellulaires .	
III.2.1 Le TPA stimule la maturation de la MMP9 dans les cellules MDCK...	69
III.3 La MMP9 est plus active dans les cellules MDCK	70
III.4 Relation entre l'expression de la MMP2 et l'activation de c-Met par son ligand le HGF	71
III.5 Expression de la MMP3, la MMP7 et la MMP14	73
III.6 Inhibition des métalloprotéases par l'Ilomastat	74
III.6.1 L'ilomastat diminue l'activité de la MMP2 ans les cellules HT1080 seulement	75
III.6.2 L'ilomastat inhibe partiellement la motilité ds cellules MSV-MDCK-INV	76
CHAPITRE IV : DISCUSSION.....	80
IV.1 La MMP2 est exprimée également dans les cellules MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV	80
IV.2 La MMP9 n'est pas régulée de même manière dans les cellules MDCK et les cellules INV	82
IV.3 Relation entre l'expression de la MMP2 et l'activation de c-Met par son ligand HGF	85
IV.4 La MMP9 est active dans les cellules MDCK uniquement	86
IV.5 Activité de la MMP2.....	87
IV.6 MMP et Motilité cellulaire.....	87
CHAPITRE V : PERSPECTIVES.....	91
CHAPITRE VI : RÉFÉRENCES	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Exemples de gènes associés à des cancers chez l'homme	23
Tableau II: Nomenclature des MMPs	30
Tableau III: Liens établis entre certains cancers et MMPs	42
Tableau IV: Les inhibiteurs tissulaires des MMPs	44
Tableau V : paramètre de migration et de transfert de protéine	58

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Shématisation du devenir d'une cellule	21
Figure 2: Structure des MMPs	32
Figure 3 : Activation de MMPs dans le milieu extracellulaire	34
Figure 4 : Modèle d'activation de pro-MMP2 par la MT1-MMP membranaire	36
Figure 5: Rôle des MMPs dans la progression tumorale	40
Figure 6 : Étapes impliquées dans la maturation du pré-pro-HGF en HGF	46
Figure 7: Shématisation du récepteur tyrosine kinase c-Met	47
Figure 8: a) La morphologie et l'organisation du cytosquelette d'actine des trois lignées cellulaires. b) Degré de phosphorylation sur les résidus tyrosine du récepteur HGF dans les trois lignées cellulaires	51
Figure 9: Expression de la MMP2 dans les lignées cellulaires MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV.	66
Figure 10: Expression de la TIMP2 dans les cellules MDCK, MSV, INV et HT1080	67
Figure 11: Expression de la MMP 9 dans les lignées cellulaires MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV	68
Figure 12: Expression et maturation de la MMP9 suite à la	

stimulation par le TPA	69
Figure 13: Activité gélatinase mesurée sur les milieux conditionnés	71
Figure 14: Effet du r-HGF et α -HGF sur le degré de phosphorylation de c-Met et le niveau d'expression de la MMP2	72
Figure 15: Activité gélatinase, en présence et en absence d'ilomastat, mesurée par zymmographie sur les milieux conditionnés	75
Figure 16: Effet de l'inhibition des métalloprotéases par l'ilomastat sur la motilité des cellules MSV-MDCK-INV et les cellules HT1080.	78
Figure 17 : Implication des voies de signalisation MAPK, PI3-Kinase dans la transcription du gène MMP2	81
Figure 18 : Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de MMP2 et 9	83

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

AMF	Facteur autocrine de motilité (<i>autocrine motility factor</i>)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AP-1	Protéine activatrice 1 (<i>activator protein-1</i>)
BSA	Albumine sérique bovine (<i>bovine serum albumin</i>)
BCA	Acide Bicinchoninique (<i>bicinchoninic acid</i>)
CAM	Molécule d'adhésion cellulaire (<i>cell adhesion molecule</i>)
Cys	Cystéine
DMEM	Milieu essentiel minimum de Dulbecco (<i>Dulbecco's minimum essential medium</i>)
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
ECL	Chémiluminescence augmentée (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EGF	Facteur de croissance épidermique (<i>Epidermal growth factor</i>)
ECM	Matrice extracellulaire (<i>extracellular matrix</i>)
ERK1/2	Protéine kinase1/2 régulée par un signal extracellulaire (<i>Extracellular signal-regulated protein kinase1/2</i>)
Ets	Facteur de transcription Ets
FBS	Sérum de bovin fœtal (<i>foetal bovine serum</i>)
FGF	Facteur de croissance fibroblastique (<i>fibroblast growth factor</i>)
HGF	Facteur de croissance hépatocytaire (<i>hepatocyte growth factor</i>)
IL-1	Interleukine 1
kDa	KiloDalton

MAPK	Protéine kinase activée par les agents mitogènes (<i>Mitogen activated protein kinase</i>)
MDCK	Lignée cellulaire issue de cellules de tubules promixaux de rein de chien isolée par les auteurs Madin et Darby (Madin-Darby canine Kidney «cells)
MSV-MDCK	Cellules MDCK transformées par le virus du sarcome de Moloney
MSV-MDCK	Cellules MDCK transformées par le virus du sarcome de Moloney et invasives
MMP	Métalloprotéase spécifique à la matrice extracellulaire (matrix metalloprotease)
MT-MMP	Métalloprotéase de type membranaire (membrane type matrix metalloproteinase)
NF-kappa B :	Facteur nucléaire Kappa B
NGF	Facteur de croissance des cellules nerveuses (neuronal growth factor)
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes sanguines (<i>platelet derived growth factor</i>)
PBS	Tampon salin à base de phosphate (<i>phosphate buffered saline</i>)
P53	Protéine de poids moléculaire 53 kDa
PI3-kinase	Phosphoinositide 3-kinase
PKC:	Proteine kinase C
PEA3	Membre de la famille de facteurs de transcription Ets

SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (<i>polyacrylamid gel electrophoresis</i>)
SF	Facteur de dispersion (<i>scattering factor</i>)
SH2	Domaine homologue de Src 2 (<i>Src-homology domain 2</i>)
SP1	Famille de facteurs de transcription
TATA	Séquence de nucleotides
TCA	Acide trichloacétique (<i>trichloroacetic acid</i>)
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
Tris	Tris (Hydroxyméthyl) Aminométhane
TIMP	Inhibiteur tissulaire de métalloprotéases (tissue inhibitor of metalloproteases)
TNF- α	Facteur onco-nécrosant (<i>tumor necrosis factor-alpha</i>)
TGF- α	Facteur de croissance transformant (<i>transforming growth factor alpha</i>)
TPA	12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate
uPA	Urokinase activatrice du plasminogène (<i>urokinase-type plasminogen activator</i>)
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i>

DÉDICACE

À toi Khalil dont le soutien ne m'a jamais fait défaut... tu as su contribuer à ta façon à l'aboutissement de ce travail que je te dédie aujourd'hui.

À mes trois enfants : Amina, Mohammad-Mahdi et Mohammad-Hussein

Votre amour, affection et gentillesse m'ont donné le goût et l'enthousiasme de faire quelque chose qui ajoute à votre fierté. C'est pour moi un immense plaisir d'écrire vos noms ici, et de vous dédier ce mémoire. Aussi dynamique et enthousiastes que vous êtes, qui sait, un jour, mon nom apparaîtra à son tour sur vos réalisations personnelles, celles qui feront votre plaisir et celui des autres.

Je vous aime tous.....

REMERCIEMENTS

Mes remerciements les plus sincères à ma directrice de recherche, Dre Josette Noël, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire. Sa passion pour son métier, sa confiance inébranlable en la vie, sa générosité, sa patience et le soutien auquel j'ai eu droit tout au long de ces travaux, qu'il soit moral, intellectuel ou financier resteront mes bases et mon élan pour de futurs travaux. Merci mille fois (*et c'est pas assez!*)

Mes remerciements chaleureux à mes parents, surtout ma mère, votre confiance, vos encouragements et soutien m'ont permis d'avancer non seulement durant les deux dernières années, mais bien depuis que je suis née. Merci à mon frère Rabih et mes deux sœurs Hiba et Inaya pour leur amitié, leur présence et leur humour.

Ce sont dans les moments les plus difficiles que l'on compte ses vrais amis. Özlem tu es la personne qui a contribué le plus à ma persévérance; ton écoute et ton support durant ces deux années m'ont fait du bien! Merci infiniment! Une pensée sympathique pour tous les membres du laboratoire, qui savent si bien rendre agréable le cadre de travail et tout particulièrement David Germain, Eugénie Goupil, Ingrid Charles, Karl-Philippe Guérard, Mohammad Amraei. Julie Vadnais et Yolaine Dodier. Un Merci particulier à Ebru avec qui je partage le bureau et bien d'autres choses et à Pierrette Fournel

Je tiens à remercier les Drs Gerardo Ferbeyre et Jean-Yves Lapointe de me faire l'honneur de s'intéresser à ce travail et de faire partie du Jury.

J'aimerais remercier le GRTM (FCAR/FRSQ) qui m'ont soutenue financièrement pour la réalisation de ce mémoire

En terminant, je ne serai peut-être jamais riche, mais je conserverai toujours en moi le bagage que chacun de vous m'avez transmis. À bien y penser, je suis déjà très fortunée.

Chapitre 1

Introduction

Revue de la littérature

I. Introduction

I.1 LE CANCER

Le cancer est une maladie très grave qui atteint de plus en plus d'individus. Avec près de 150 000 décès par an, les cancers représentent la seconde cause de mortalité derrière les maladies cardiovasculaires. Au Canada, d'après les taux d'incidence actuels, 38 % des femmes risquent d'être touchées par le cancer au cours de leur vie « dont 9% du cancer du sein ». La proportion est de 43 % chez les hommes « dont 30% du cancer de prostate ». D'où l'importance de comprendre d'avantage les causes de cette maladie et d'y trouver un remède efficace. Une connaissance plus approfondie des processus moléculaires et biochimiques qui interviennent dans toutes les formes de cancer contribuera à développer des médicaments contre des cibles tumorales précises. La recherche fondamentale est le seul moyen qui pourra, un jour, nous permettre de mieux contrôler cette maladie.

I.1.1 DÉFINITION

Dans un organisme, le devenir de chaque cellule est minutieusement contrôlé. Selon les signaux qu'elle reçoit (**Figure 1**), une cellule peut se diviser, se différencier, rester quiescente ou même mourir par apoptose ou par nécrose. L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus normal qui joue un rôle fondamental dans le développement et l'homéostasie cellulaire (107). Les cellules en apoptose subissent des modifications morphologiques caractéristiques : la cellule et son noyau rétrécissent, se condensent et se fragmentent en corps apoptotiques. La membrane plasmique ne se rompt pas mais exprime des signaux de mort reconnus par les macrophages, qui phagocytent les corps apoptotiques sans réponse inflammatoire (185). Lorsqu'une cellule n'obéit plus à ces signaux, elle se divise sans cesse. Cette prolifération cellulaire incontrôlée entraîne la formation d'une masse tumorale qui, interfère avec la physiologie normale de l'organisme et peut causer sa mort. Le cancer est donc une maladie qui se définit, à l'origine, par la transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale. Cette cellule tumorale se divise en une

descendance de cellules qui restent sourdes aux signaux que l'organisme impose normalement aux cellules normales.

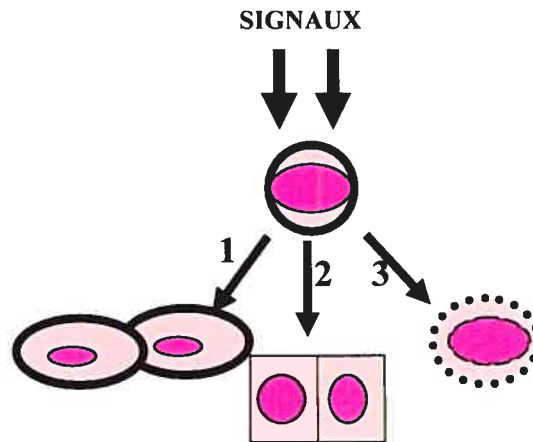


Figure 1 : Le devenir de toute cellule se résume à trois possibilités; prolifération (1), différenciation (2) et apoptose (3). Une cellule devient cancéreuse lorsque au moins un de ces processus est altéré.

I.1.2 CLASSIFICATION DES CANCERS

Il existe de très nombreux types de cancer différents car toutes les cellules de l'organisme sont susceptibles d'être transformées. Par conséquent, on divise les cancers en fonction de leur origine. Ainsi, les carcinomes sont des cancers de cellules épithéliales (d'origine ectodermique ou endodermique) et les sarcomes sont des cancers d'origine mésodermique, et les leucémies et les lymphomes sont des sarcomes particuliers affectant les cellules du système sanguin. Les tumeurs sont ensuite définies d'après l'origine du tissu concerné et les caractéristiques histologiques de la cellule tumorale.

I.1.3 ÉVÉNEMENT GÉNÉTIQUE DU CANCER

Au niveau génétique, le cancer s'explique par une expression excessive des gènes stimulant la croissance et/ou une expression insuffisante ou nulle des gènes qui la limitent. Des lésions (non-réparées) au niveau de l'ADN sont toujours la cause déclenchant un processus tumoral. Dans une cellule normale, on retrouve ainsi deux catégories de gènes influençant la croissance cellulaire ; les **proto-oncogènes** qui la stimulent et les **anti-oncogènes** qui la réduisent. Ces deux groupes de gènes

concernent les deux grandes voies cellulaires réglant la croissance cellulaire ; les voies de la stimulation et les voies de l'inhibition. Ces deux voies représentent le réseau de communication cellulaire qui repose sur le bon fonctionnement de toutes les protéines « relais », partant des signaux externes de la surface de la cellule jusqu'au noyau. Au noyau, un mécanisme moléculaire intègre tous les signaux de stimulation et d'inhibition, décidant si la cellule entre en division ou non.

I.1.3.1 LES PROTO-ONCOGÈNES ET LA STIMULATION DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

Les proto-oncogènes sont des gènes normaux qui stimulent la croissance cellulaire. Ils codent pour des protéines qui régissent la croissance, la division et l'adhérence cellulaire par les voies de la stimulation. Les signaux extracellulaires, tels les facteurs de croissance, diffusent dans le milieu intercellulaire, et se lient à des *récepteurs* membranaires spécifiques. Suite à cette liaison, il y a activation de nombreuses *protéines « relais »*, dans le cytoplasme, lesquelles transmettent les signaux jusqu'au noyau. L'ensemble de ces étapes en cascade est appelé signalisation intracellulaire. Là, d'autres protéines, des *facteurs de transcription*, activent divers gènes qui déclenchent le cycle de croissance cellulaire (division).

Certains oncogènes i.e les formes mutées de proto-oncogènes normaux, déclenchent une surproduction de facteurs de croissance (ex. : *Transforming growth factor α - TGF α*) qui conduit au développement de cancers. D'autres oncogènes codent pour des récepteurs anormaux qui émettent des signaux de prolifération cellulaire même en absence de ligand (ex. : *Erb-2 tableau I*), dans le cas du cancer du sein (160), et c-Met dans le cas de carcinome rénal ou d'hépatome (128). D'autres oncogènes dont ras (108) perturbent des protéines servant de « relais ». Les protéines mutées entraînent la prolifération, même en absence des signaux émis par les récepteurs des facteurs de croissance.

I.1.3.2 LES ANTI-ONCOGÈNES ET L'INHIBITION DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

Les anti-oncogènes (ou suppresseurs de tumeurs) sont des gènes normaux codant pour des protéines qui inhibent la division cellulaire donc inhibent la croissance cellulaire. Comme pour les voies de la stimulation, les voies de l'inhibition agissent en cascade et impliquent diverses protéines de la surface cellulaire jusqu'au noyau. Certains cancers résultent de l'inactivation des anti-oncogènes, comme par exemple, les cancers héréditaires non-polyposiques du côlon, qui présentent des récepteurs membranaires insensibles au facteur TGF- β (21), lequel inhibe normalement la croissance cellulaire.

Tableau I Exemples de gènes associés à des cancers chez l'homme

Gène	Rôle physiologique	Cancers	Références
PDGF	code pour le facteur de croissance PDGF impliqué dans la prolifération cellulaire.	Gliomes malins (tumeurs cérébrales)	(30)
Erb-B	code pour le récepteur du facteur de croissance EGF, impliqué dans la prolifération cellulaire.	Glioblastomes (tumeurs cérébrales)	(76)
c-myc	code pour un facteur de transcription activant des gènes de prolifération.	Leucémies, cancer du sein, estomac, pancréas	(34)
p53	code pour une protéine de poids moléculaire 53 kDa qui peut interrompre la division cellulaire et déclencher l'apoptose.	Cancer du sein	(159)

I.1.4 LES NOUVELLES PROPRIÉTÉS CELLULAIRES

Les propriétés cellulaires correspondant à ces transformations génétiques sont indispensables pour franchir les étapes successives de la cascade métastatique (50). Il s'agit de l'angiogenèse, de la perte de cohésion tissulaire, de la production de molécules d'adhésion, de la sécrétion d'enzymes protéolytiques, de la motilité cellulaire, de la capacité de survie dans le sang, de l'extravasation et enfin de l'invasion. Ces différentes étapes dans la progression du cancer/métastase seront décrites succinctement (127).

I.1.4.1 L'ANGIOGENÈSE

À l'état normal, à l'exception de la grossesse, la croissance physiologique (enfant), le cycle menstruel et la restauration tissulaire post-traumatique, l'endothélium n'est soumis qu'à un renouvellement cellulaire extrêmement lent (29). Dans un état pathologique comme le cancer, une angiogenèse importante est souvent observée. L'angiogenèse est indispensable à la croissance de la tumeur primitive (52, 73, 105) car elle permet un apport de nutriments au sein même de la tumeur. Elle résulte de l'activité d'un ou de plusieurs facteurs angiogéniques fournis par les cellules malignes et les fibroblastes, dont les TGF, les FGF, l'angiogénine et le VEGF (39, 105) et/ou de la sous-expression d'inhibiteurs comme l'angiostatine, un fragment du plasminogène ou de la forme tronquée de la thrombospondine-1 codée par le gène suppresseur p53 (143).

I.1.4.2 LA PERTE DE COHÉSION TISSULAIRE

La perte de cohésion tissulaire permet la séparation des cellules. Elle résulte d'un dysfonctionnement de molécules d'adhésion cellulaire ou CAM (*Cellular adhesion molecule*) (118). La cadhérine E, en particulier, est une glycoprotéine transmembranaire spécifique des épithélia qui, en présence de calcium, se lie à une protéine identique présentée à la surface d'une cellule voisine. Considérée comme le produit d'un gène suppresseur de l'invasion, elle a une expression inversement proportionnelle à l'activité invasive des cellules cancéreuses, notamment mammaires et

prostatiques (63, 171, 173). En effet, le gène correspondant est localisé sur un segment de chromosome qui est fréquemment perdu au cours du développement du cancer de la prostate (35). Certains attribuent l'expression réduite de cadhérine E dans les tumeurs mammaires et prostatiques à une hyperméthylation de la séquence promotrice du gène (162).

I.1.4.3 LES MOLÉCULES D'ADHÉSION

Pour pouvoir envahir successivement la membrane basale de l'épithélium d'origine, le stroma interstitiel et la paroi d'un vaisseau sanguin, la cellule tumorale doit d'abord y adhérer. Cet attachement est facilité par la surexpression d'un ou de plusieurs récepteurs intégrine spécifiques des substrats de la matrice extracellulaire, en particulier, la laminine, la fibronectine et le collagène de type IV (118). La cellule métastatique pourrait également exprimer des variants de la glycoprotéine CD44, un récepteur spécifique du hyaluronate. Lorsque activé, CD44 joue normalement un rôle dans la migration des lymphocytes et leur fixation à l'endothélium des veinules. Il permet aussi l'adhésion de cellules cancéreuses de rat à la matrice extracellulaire ainsi qu'aux cellules endothéliales (70, 115). L'intégrine VLA-4, spécifique de la fibronectine et surexprimée par les lignées cellulaires de mélanomes, serait responsable de leur adhésion à l'immunoglobuline endothéliale VCAM-1 (75).

I.1.4.4 LES PROTÉASES

La destruction enzymatique des membranes basales qui compartimentent les tissus est une facette essentielle du processus d'invasion (19, 75). Des métalloprotéases matricielles sont produites par les cellules néoplasiques et surtout par les fibroblastes du stroma péri-tumoral (20). Ainsi, la stromélysine-3, destinée à lyser les protéoglycans, la laminine, le collagène de type IV et la fibronectine de la membrane basale (105), est exprimée par les cellules stromales entourant des carcinomes mammaires invasifs, en réponse à un ou plusieurs facteurs libérés par la cellule tumorale, comme le β FGF, le PDGF ou l'EGF.

I.1.4.5 LA MOTILITÉ CELLULAIRE

Les mouvements cellulaires sont normalement limités par les interactions avec les protéines extracellulaires ainsi qu'avec les cellules voisines. Indissociable des mécanismes d'adhésion et de protéolyse, la motilité complète le caractère métastatique. Elle est favorisée par la production de molécules stimulantes ou par une sensibilité modifiée à celle-ci. Le *scatter factor* induit la dispersion de cellules épithéliales et augmente la mobilité des cellules (59). Il est synthétisé par les fibroblastes et se fixe sur la cellule cancéreuse par l'intermédiaire d'un récepteur à activité tyrosine kinase codé par l'oncogène *c-met* (139). Des cellules de mélanome humain sécrètent l'AMF (*autocrine motility factor*), facteur de motilité autocrine (104). Il interagit avec une protéine G transductrice de signal, codée par le gène suppresseur nm23 (105, 157) pour modifier le cytosquelette et induire la formation de pseudopodes. La mobilité peut encore être favorisée par de nombreuses molécules dont le TNF (88) et le FGF (27) ainsi que par des produits de la protéolyse matricielle (31).

I.1.4.6 LE TRANSPORT HÉMATOGÈNE

L'intravasation s'effectue au niveau des néocapillaires tumoraux ou de veinules dont la paroi fine offre peu de résistance à la pénétration par la cellule tumorale (50, 51). Rendue dans le courant sanguin, la cellule se trouve en suspension alors qu'elle avait toujours été en contact avec un substrat solide. Des chercheurs suggèrent que, pour se déplacer dans les vaisseaux, certaines cellules tumorales utiliseraient plutôt des mécanismes d'adhérence à l'endothélium, propres aux leucocytes circulants (75, 118). Ainsi, l'expression d'un dérivé sialique antigénique, ligand spécifique de la sélectine endothéliale ELAM-1, a été mise en évidence dans une lignée de carcinome du côlon (75, 118).

I.1.4.7 L'EXTRAVASATION

La cellule cancéreuse, présente dans un vaisseau, doit d'abord se fixer à l'endothélium à un site secondaire propice à son adhésion. Ensuite, les cellules endothéliales se rétractent (125), exposant la membrane basale, riche en laminine, en collagène IV favorisant un gradient d'adhésion et par conséquent, l'extravasation. La

membrane basale est alors dégradée grâce aux enzymes protéolytiques des cellules tumorales. L'invasion peut alors avoir lieu. Pour former une métastase significative, la cellule doit trouver un environnement favorable à sa prolifération et à sa survie.

I.2 MOTILITÉ ET INVASION CELLULAIRE

De nombreuses cellules ont la capacité de se déplacer au sein d'un organisme. Certaines cellules du système immunitaire migrent vers le lieu d'une infection pour combattre l'agent pathogène. D'autres cellules, dite "cellules précurseurs", migrent dans l'embryon au cours du développement embryonnaire pour former de nouvelles structures. Toutefois, le dérèglement de la capacité de déplacement d'une cellule a des conséquences dramatiques. Ainsi dans le cas du cancer, l'augmentation de la motilité des cellules malignes leur permet de s'échapper du centre de la tumeur initiale pour envahir l'organisme et former des métastases.

La membrane basale constitue le premier rempart contre l'invasion tumorale. La dégradation de cette membrane est cruciale pour l'invasion des cellules malignes et la formation des métastases. Il s'agit d'une spécialisation de la matrice extracellulaire, se présentant comme une mince couche de 50 à 200 nm d'épaisseur, limitant entièrement les structures épithéliales et vasculaires. Elle forme une frontière avec le tissu conjonctif.

Les membranes basales sont constituées essentiellement de laminine, de collagène de type IV, de fibronectine et d'héparane sulfate protéoglycan. Elles jouent un rôle primordial dans la morphogenèse, la différenciation cellulaire, l'architecture tissulaire et l'adhérence cellulaire.

Cette dégradation est médiée par des enzymes protéolytiques sécrétées par différents types de cellules, participant à l'invasion de cellules tumorales. Parmi ces enzymes on trouve la famille des métalloprotéases

I.3 LES MÉTALLOPROTÉASES MATRICIELLES (MMPs)

Les métalloprotéases matricielles (MMP) constituent une famille de protéases impliquées dans la dégradation des constituants de la matrice extracellulaire. La famille des métalloprotéases comprend 25 endopeptidases dépendantes du zinc,

collectivement capables de dégrader essentiellement toutes les composantes de la matrice extracellulaire

I.3.1 CLASSIFICATION

Selon leur spécificité et leur substrat préférentiel, les MMPs peuvent être classées en au moins 5 groupes distincts : collagénases, stromélysines, gélatinases, matrilysines et MMPs de type membranaire (MT-MMPs : *Membrane Type Matrix Metalloproteinases*) (**Tableau II**). Les collagénases (MMP-1, MMP-8, MMP-13, et MMP-20) initient spécifiquement la dégradation de fibres de collagène de type I, II et III. Elles clivent la triple hélice pour donner deux fragments correspondant aux 3/4 N-terminal et 1/4 C-terminal. Cette coupure provoque le déroulement de la triple hélice et libère un collagène dénaturé (aussi appelé gélatine), alors accessible aux protéases non spécifiques (100). La spécificité de ces collagénases est variable : la collagénase 1 (MMP-1 ou collagénase interstitielle) dégrade le collagène de type III plus efficacement que les types I et II tandis que la MMP-8 (ou collagénase 4) est plus active sur le type I. La collagénase 3 (MMP-13) possède une spécificité de substrat plus large. Outre les fibres de collagène et la gélatine, la MMP13 dégrade aussi le collagène de type IV, IX, X et XIV. Cette collagénase possède également un site de clivage supplémentaire et clive le collagène de type I au niveau de son domaine N-terminal.

Les gélatinases ou collagénases de type IV sont classées en deux types : la gélatinase A ou gélatinase de 72 kDa (MMP-2) et la gélatinase B ou gélatinase de 92 kDa (MMP-9). Ces deux enzymes dégradent principalement le collagène dénaturé (clivé) et le collagène de type IV. Des études récentes leurs attribuent également une activité collagénolytique, i.e. que la MMP-2 est capable de cliver le collagène de type I, sous forme de triple hélice, en fragments 3/4 N-terminal, 1/4 C-terminal identiques à ceux générés par les membres de la famille des collagénases, décrites ci-dessus (3). De même, la MMP-9 exprimée par les ostéoclastes durant le développement foetal de la souris est capable de cliver les collagènes de type I, II et V dans la partie N-terminale (85).

Les stromélysines possèdent une spécificité de substrat très large. Les stromélysines-1 (MMP-3) et -2 (MMP-10) sont capables de dégrader les protéoglycans, les laminines, la fibronectine, l'élastine, la gélatine, les collagènes de type IV, V, IX et X (**Tableau II**). La stromélysine-3 (MMP-11), quant à elle, dégrade les protéoglycans et la fibronectine.

Les MMPs de type membranaire (MT-MMPs) forment un sous-groupe d'au moins 4 isoformes (**Tableau II**). La spécificité de substrat de la MT1-MMP (MMP-14) est la mieux connue. Si des études récentes ont montré qu'elle pouvait dégrader certains composés de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine et les collagènes de type II et III (129, 141), cette activité semble faible (44). Les MT1-MMP, MT2-MMP et MT3-MMP sont également décrites comme activateurs physiologiques de la MMP-2. Il est également à noter qu'une forme soluble de la MT3-MMP a été décrite chez l'homme (113). Provenant d'un épissage différentiel du gène codant la MT3-MMP, cette forme est capable d'activer la proMMP-2 mais aussi de dégrader différents substrats matriciels (fibronectine, collagène de type III).

Les matrilysines (MMP-7 et 26) possèdent un spectre de dégradation très large : fibronectine, laminine, entactine, collagène de type IV et protéoglycans.

Les autres MMPs ont été clonées et désignées comme faisant partie de la grande famille des MMPs d'après le pourcentage d'homologie en acides aminés et la présence de motifs particuliers à ces protéases (cf. ci-dessous). Ainsi, MMP-18 (40), MMP-19 (132) et les MMPs-11,12,20,17,23 et 25 font partie de cette famille mais leur spécificité de substrat n'est pas encore connue.

TABLEAU II : Nomenclature des MMPs

Protéases	MMP	P. M.* (kDa)
Collagénases		
Collagénase 1	MMP1	52/41
Collagénase 2	MMP8	85/64
Collagénase 3	MMP13	65/55
	MMP20	54/43
Stromélysines		
Stromélysine 1	MMP3	57/45, 28
Stromélysine 2	MMP10	56/47, 24
Gélatinases		
Gélatinase A	MMP2	72/67
Gélatinase B	MMP9	92/67
Matrilysines		
Matrilysine 1	MMP7	28/19
Matrilysine 2	MMP26	29/19
Métalloprotéases membranaires		
MT1-MMP	MMP14	66/60
MT2-MMP	MMP-15	68/62
MT3-MMP	MMP16	64/55
MT5-MMP	MMP24	73/64
Autres		
	MMP11	58/28
	MMP28	56/45
	MMP19	57
	MMP12	54/45
	MMP17	71/67
	MMP25	62/58
	MMP23	66
	MMP18	53/51

Lorsque plus d'un poids moléculaire est indiqué, les différentes valeurs de poids moléculaires correspondent aux différentes formes de la protéine, soit respectivement les pro-formes et les formes matures. Lorsqu'une seule valeur est indiquée, elle correspond à celui de la forme mature active. * P. M. : poids moléculaire.

I.3.2 STRUCTURE

La structure primaire des MMPs contient cinq domaines fonctionnels (**Figure 2**) : **1-** une séquence signal (le pré-domaine) nécessaire à leur acheminement intracellulaire jusqu'à la surface cellulaire et dont le clivage intracellulaire fournit le signal de sécrétion, **2-** un pro-domaine N-terminal de 8 kDa responsable du maintien de l'enzyme sous sa forme inactive et caractérisé par la séquence conservée proline-arginine-cystéine-glycine-valine-proline-aspartate (PRCGVPD) dans laquelle la cystéine est coordonnée au zinc (Zn^{2+}) du site actif; ce domaine est rapidement éliminé après la sécrétion et est absent de la forme enzymatique mature, **3-** un domaine catalytique contenant la séquence histidine-glutamate-X-X-histidine-X-X-glycine-X-X-histidine (HEXXHXXGXXH) dont les trois résidus histidines constituent des ligands pour l'ion Zn^{2+} du site actif, **4-** un domaine charnière riche en proline et finalement, **5-** un domaine C-terminal contenant une séquence apparentée à celle de l'hémopexine ou à la vitronectine (autrement appelée *hémopexin* ou *vitronectin-like*).

Il est à noter que la MMP-7 fait exception car elle ne possède, dans sa structure, que les trois premiers domaines parmi les cinq décrits ci-dessus (134). Les gélatinases contiennent un domaine supplémentaire en aval du domaine de liaison du zinc. Ce domaine, dit *fibronectin-like* en raison de son homologie avec la protéine du même nom, est responsable de la forte affinité de ces enzymes pour le collagène et la gélatine (120). La MMP-9 et les MT-MMPs contiennent également un domaine homologue à la chaîne $\alpha 2$ du collagène de type V (180). Les MT-MMPs possèdent un domaine additionnel à l'intérieur du domaine catalytique qui permet leur ancrage à la membrane plasmique (145). En outre, elles partagent avec la stromélysine-3 une séquence de 10 résidus située entre le pro-domaine et le domaine catalytique qui est homologue aux séquences de reconnaissance des enzymes *furin-like* (144).

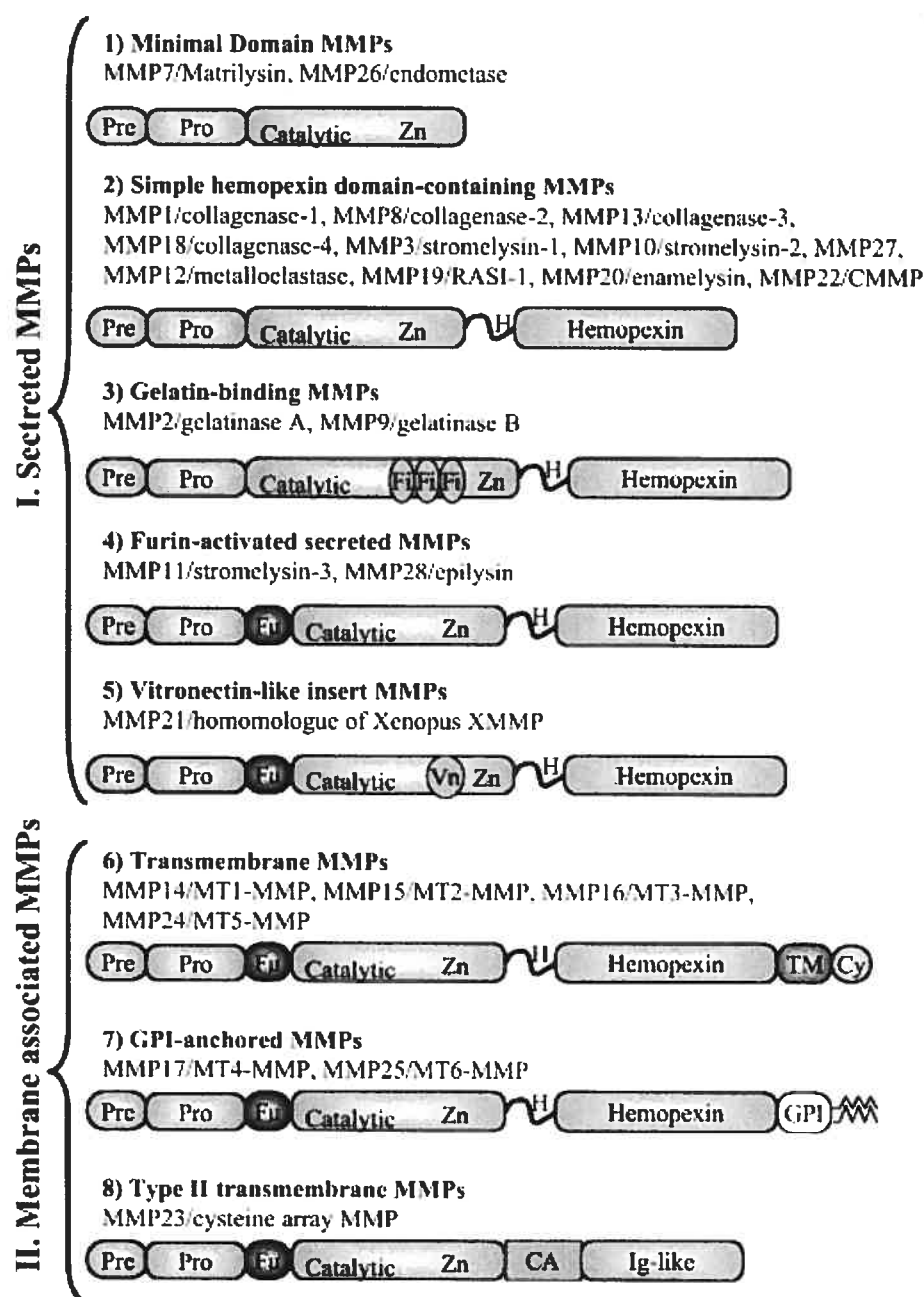


Figure 2 : Structure des MMPs appartenant aux différentes classes. Les différents membres de chaque classe sont indiqués ainsi que les différents domaines constituant les différentes MMPs. Les différents domaines sont : Pre, séquence signal; Pro, propeptide; Fu, site *furin-like*; Zn, site de liaison pour le zinc; Fi, (*fibronectin like*) ; H, région charnière (*hinge*); Vn, site de liaison à la vitronectine (*vitronectin like*); TM, domaine transmembranaire; Cy, queue cytoplasmique; GPI, domaine de liaison au glycosyl phosphatidylinositol; CA, *Ig-like*, site *immunoglobulin-like*. Adapté de (155).

I.3.3 ACTIVATION DES MMPs:

L'absence d'activité enzymatique des formes zymogènes ou pro-enzymes résulte de l'interaction entre le zinc (Zn^{2+}) du site actif et un résidu cystéine (Cys) présent dans le pro-domaine de la protéine (**Figure 3**). L'activation enzymatique est due à la dissociation Cys-Zn^{2+} et à la fixation d'une molécule d'eau sur l'atome de Zn, suivie d'une auto-protéolyse qui libère le pro-fragment de l'extrémité N-terminale, rendant ainsi le site actif accessible. La rupture de cette interaction Cys-Zn^{2+} (*Cystein switch*) peut se produire sous l'influence des radicaux libres, par des agents physiques comme la chaleur (92) ou par clivage protéolytique du pro-peptide (**Figure 3**). Ainsi, plusieurs protéinases à sérine, dont les plus importantes sont la plasmine, la trypsine et la chymase des mastocytes, peuvent activer certaines MMPs (131, 137), mais aussi les MMP3, 7 et les MMPs membranaires sont des activateurs potentiels de plusieurs MMPs. Les MMPs agissent donc en cascade.

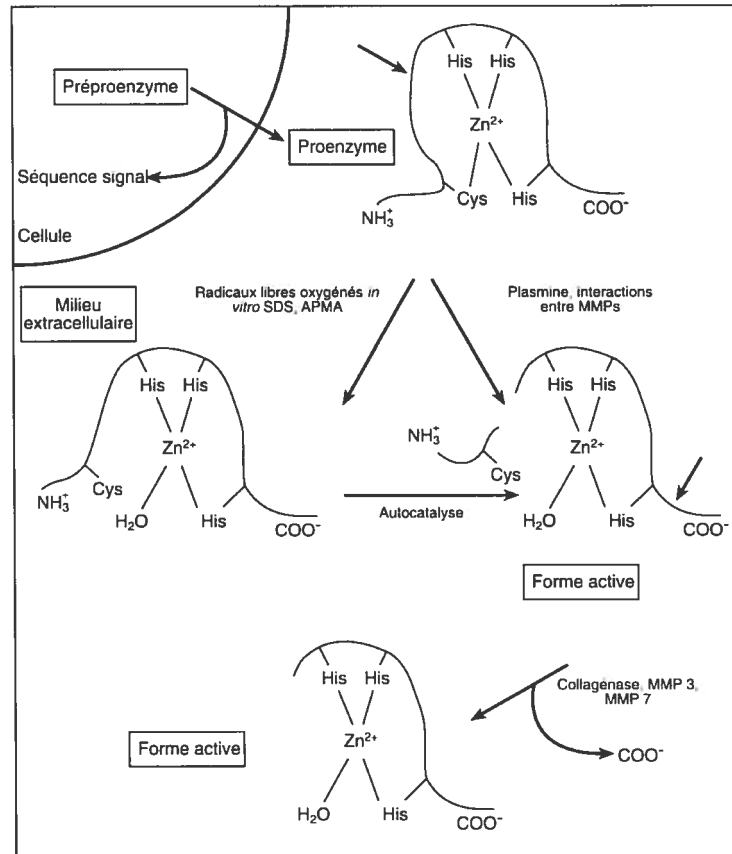


Figure 3 : Activation des MMPs dans le milieu extracellulaire. AMPA (*alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*)-type glutamate receptor). Tirée de (155)

Bien que les mécanismes d'activation des MMPs *in vivo* ne soient pas encore totalement élucidés, quatre voies d'activation sont possibles. Elles sont décrites ci-dessous.

I.3.3.1 Activation extracellulaire des MMPs par des protéinases “non-MMPs”

L'activation extracellulaire des MMPs par des protéinases “non-MMPs” fait intervenir la cascade de la plasmine et peut se produire à la surface cellulaire *via* le récepteur de l'uPA « *urokinase plasminogen activator* » ou être distant du site de sécrétion de l'enzyme (148). Dans ce système, le plasminogène est clivé en plasmine par l'uPA ou le tPA (*tissue plasminogen activator*), l'activateur tissulaire de la plasmine. La plasmine ainsi formée peut alors activer totalement la stromélysine et partiellement, la collagénase interstitielle. La stromélysine active peut augmenter l'activité de la collagénase interstitielle par un clivage d'un peptide de l'extrémité C-terminale de la molécule. Un autre exemple de ce type d'activation est fourni par la thrombine; cette protéinase est en effet capable d'activer la MMP-2 (58, 186).

I.3.3.2 Activation extracellulaire des MMPs par d'autres MMPs

L'activation extracellulaire des MMPs par d'autres MMPs. La matrilysine MMP7 a ainsi été décrite comme étant capable d'activer les proMMP-2, -3 et -9. La proMMP-9 peut également être activée par la MMP-2 (55). La MMP10 est capable d'activer les pro-MMP7 et 9 (122).

I.3.3.3 Activation intracellulaire des MMPs par la furine

La furine est une protéinase à sérine du réseau trans de l'appareil de Golgi qui reconnaît la séquence (RXKR) portée par les stromélysines -1, -2, -3 et les MT-MMPs. Cependant, ce type d'activation n'a, à ce jour, été montré que pour la pro-stromélysine-3 et la MT1-MMP (144).

I.3.3.4 Activation des MMPs par les MT-MMPs

L'activation par les MT-MMPs semble ne concerner que la proMMP-2 (**Figure 4**). A l'inverse des autres MMPs, l'activation de la proMMP-2 se produit à la surface cellulaire et fait intervenir les MT-MMPs. Le rôle des MT-MMPs n'est pas totalement clair et fait encore l'objet de nombreux travaux même si un rôle de récepteur membranaire de la pro-enzyme est couramment admis (150). Actuellement, il semble que le système d'activation de la proMMP-2 ferait intervenir un complexe tertiaire

entre la MT1-MMP, le TIMP2 (défini à la section I.3.5.2) et la proMMP-2 (48, 91, 158).

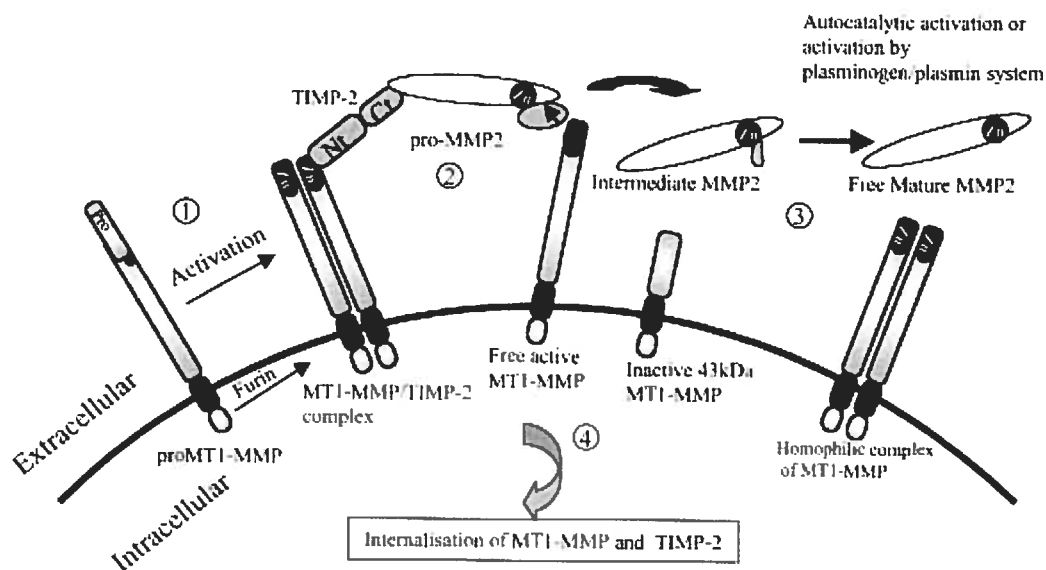


Figure 4 : Modèle d'activation de la pro-MMP2 par la MT1-MMP membranaire.

(1) pro-MT1-MMP peut être activé dans la cellule (activation intracellulaire) par les furines ou à l'extérieur de la cellule (activation extracellulaire) par les plasmines. (2) TIMP-2 joue le rôle d'une molécule adaptatrice en liant MT-MMP1 à pro-MMP-2. Une seconde TIMP-2 clive une portion du pro-domaine MMP2, ce qui aboutit à la formation d'un intermédiaire MMP2 (3) Cet intermédiaire est alors activé par clivage autocatalytique ou par le système plasminogène/plasmine, est une molécule MMP2 active est mature est alors libérée à la surface de la cellule (4) MT1-MMP, dans le présent exemple, et TIMP2 sont alors internalisés dans le cytoplasme. Nt, est la partie N-terminale et Ct, est la partie C-terminale de TIMP2. Adapté de (155).

I.3.4 RÔLE DES MÉTALLOPROTÉASES

I.3.4.1 Rôle physiologique

Le remodelage de la matrice extracellulaire indispensable à la cicatrisation des blessures, l'embryogenèse, l'angiogenèse ou le cycle reproducteur féminin nécessite l'action des métalloprotéases de la matrice extracellulaire. Les MMPs jouent un rôle essentiel dans la dégradation de la matrice soutenant les cellules en dégradant les membranes basales et les tissus conjonctifs.

I.3.4.1.1 Collagénases

Lors du processus de cicatrisation, les collagénases sont principalement produites par les kératinocytes basaux de l'épiderme. Différentes études immunohistologiques ont, en effet, montré une expression de la collagénase interstitielle (MMP1) au niveau des kératinocytes motiles qui sont au contact des composants de la matrice extracellulaire (82, 141). Cette interaction entre les kératinocytes et la matrice dermique, en particulier avec le collagène de type I, pourrait fournir un signal précoce d'initiation de la réponse épithéliale à la blessure. D'autres études réalisées *in vivo* ou *in vitro* ont permis de montrer que cette interaction impliquait des récepteurs de type intégrine exprimés constitutivement ($\alpha1\beta1$; $\alpha2\beta1$; $\alpha3\beta1$; $\alpha6\beta4$) ou sélectivement ($\alpha5\beta1$; $\alpha1\beta3$) par les cellules motiles (116, 169). La synthèse de collagénase par ces cellules peut aussi être influencée par des facteurs solubles tels l'interleukine-1 (IL-1) et le facteur de croissance tumoral (TGF- α) présents dans l'environnement de la blessure ou produits par l'épiderme (116, 169).

Certains travaux ont également mis en évidence une expression de collagénase dans le derme superficiel au niveau des cellules mésenchymateuses et inflammatoires (110, 141). L'activité de dégradation des collagénases pourrait être impliquée dans différentes étapes de la cicatrisation, en fonction du compartiment dans lequel elles s'expriment et/ou agissent. Ainsi, dans l'épiderme, le rôle des collagénases serait essentiellement de promouvoir la migration cellulaire. La dégradation du collagène de type I permettrait aux kératinocytes de se dissocier localement de leur substratum et de migrer pour reformer un néo-épithélium. En revanche, l'activité collagénolytique du

derme permettrait le remodelage matriciel du tissu de granulation (structure constituée par la prolifération d'un tissu conjonctif jeune et riche en vaisseaux)

I.3.4.1.2 Stromélysines

Les différentes isoformes des stromélysines ont été détectées lors de la cicatrisation de blessures aiguës et chroniques (110, 142). Bien que ces enzymes possèdent une large spécificité de substrats et une organisation protéique similaire, leur localisation au sein du tissu est très différente. Ainsi, la stromélysine-2 est uniquement produite par les kératinocytes situés au front de migration de l'épithélium. Les kératinocytes en question sont les mêmes que ceux exprimant la collagénase interstitielle. La stromélysine-1 est également produite à ce niveau mais par une population de kératinocytes différente, dans des cellules proliférantes, à l'arrière du front de migration. Ces cellules sont encore au contact des différents composants de la membrane basale. D'autre part, un fort signal pour l'expression de la stromélysine-1 est également détecté au niveau des fibroblastes du tissu de granulation (110, 142).

Le profil d'expression de la stromélysine-3 a été étudié chez le rat dans la cicatrisation dermique de blessures aiguës et montre une localisation des ARNm confinée dans le tissu stromal; on note une co-localisation avec les ARNm de la MMP-2 et de la MT1-MMP (130).

L'expression de ces stromélysines peut être modulée par les cytokines présentes dans le tissu. Des études réalisées *in vitro* ont ainsi montré que l'EGF et le TNF stimulent l'expression de stromélysine-2 tandis que l'IL-1, le PDGF, l'EGF, le TNF- α augmentent celle de la stromélysine-1 par les fibroblastes ou les kératinocytes (109). A la différence des collagénases qui possèdent un spectre d'action limité aux fibres de collagène (type I, II, III), les stromélysines sont capables de dégrader de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire telles la fibronectine, laminine, collagène de type IV. Cette grande diversité de substrat et la localisation tissulaire de ces enzymes tendent à suggérer un rôle de la stromélysine-2 dans la migration des kératinocytes *via* la dégradation des molécules de la membrane basale. Un rôle d'activateur de la MMP-9 est aussi envisagé. Localisée dans les cellules prolifératives, la stromélysine-1, synthétisée par les kératinocytes basaux de l'épiderme, semblerait davantage impliquée

dans le remodelage tissulaire précédant la formation d'une nouvelle membrane basale. Dans le derme, les stromélysines -1 et -3 peuvent être impliquées dans la formation et le remodelage du tissu de granulation et/ou dans des processus qui y sont associés tels l'angiogénèse, l'extravasation et la migration de cellules inflammatoires (117).

I.3.4.1.3 Gélatinases

L'étude de l'expression des gélatinases pendant la cicatrisation cutanée montre de grandes différences spatiales et temporelles en fonction de l'isoforme considérée. La MMP-9 semble impliquée dans les phénomènes précoces de la réparation ; son expression augmente dès le premier jour après la blessure et diminue rapidement. Cette expression est associée à la migration, dans le foyer de la blessure, des cellules inflammatoires qui la sécrètent : neutrophiles, éosinophiles, macrophages. Des études d'hybridation *in vitro* montrent également une synthèse de MMP-9 au niveau des régions proliférantes de l'épithélium et plus tardivement, au niveau du tissu de granulation. Ces localisations peuvent s'expliquer par l'expression de l'enzyme à la fois dans les kératinocytes et les cellules endothéliales capillaires (110). Si la MMP-2 est exprimée constitutivement, sa production augmente après une blessure. Son profil d'expression diffère des autres MMPs avec un pic plus tardif, et surtout une expression exclusivement mésenchymateuse, pendant la formation du tissu de granulation. Récemment, des études de immunohistochimie ont permis de montrer que la protéine MMP-2, dans ce tissu, était co-localisée avec celle de la MT1-MMP (110, 130).

L'ensemble de ces données permet d'envisager des rôles distincts pour ces deux enzymes. La MMP-9 serait davantage impliquée dans les étapes plus précoces telles que le détachement des kératinocytes de la membrane basale, la migration de ces cellules et le remodelage des matrices provisoires (fibrine-fibronectine) (145). La MMP-2 paraît, pour sa part, agir plus tardivement dans les phases de remodelage de la matrice extracellulaire (85, 130).

I.3.4.2 Rôle des MMPs dans le cancer

Un déséquilibre dans l'expression et l'activité des MMPs a une importance sur diverses pathologies comme la sclérose en plaque, la maladie d'Alzheimer ou le

développement de métastases (36). Le rôle des MMPs dans le développement du cancer a fait l'objet de recherches intensives depuis plus de deux décennies (**Tableau III**). Un rôle important fut initialement attribué à la capacité des MMPs de dégrader la matrice extracellulaire, favorisant ainsi l'invasion tumorale. On sait maintenant que, en plus de leur rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire, les MMPs ont une activité protéolytique également dirigée contre des protéines non-matricielle. Elles jouent alors un rôle complexe dans plusieurs autres étapes de la progression tumorale (perte d'adhésion, prolifération, invasion et angiogénèse) (36) (**Figure 5**).

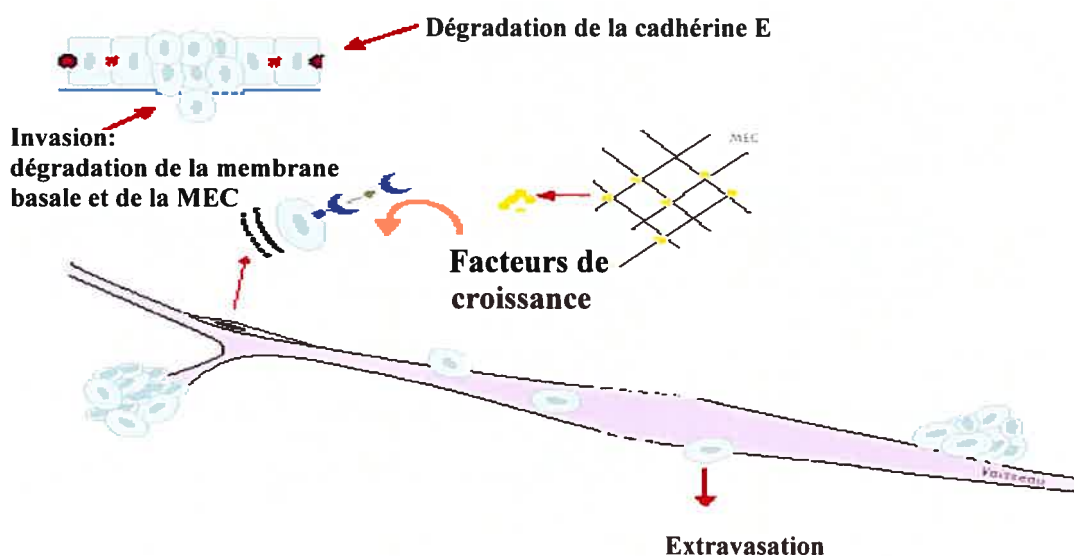


Figure 5: Rôle des MMPs dans la progression tumorale. Voir la description détaillée dans le texte. Adapté de (36).

I.3.4.2.1 Perte d'adhérence

Certaines MMPs, en particulier la MMP3 et la MMP7, ont tout d'abord été impliquées dans la perte d'adhérence cellulaire et la modification phénotypique des cellules épithéliales qui se produisent durant les premiers stades du développement d'une tumeur. Ces enzymes peuvent en effet digérer la cadhérine E et, de ce fait,

rompre les adhérences intercellulaires des épithélia et stimuler l'expression de gènes promoteurs du cancer en favorisant le transfert de la caténine β , à partir de la cadhérine E, vers le noyau cellulaire (106).

I.3.4.2.2 Invasion

L'invasion locale est la seconde étape de la progression tumorale dans laquelle les MMPs sont impliquées. En effet, plusieurs MMPs en particulier les gélatinases (MMP2 et MMP9) ont une activité protéolytique dirigée contre la protéine la plus abondante de la membrane basale soit le collagène de type IV. Il a été démontré par Kugler *et al* (95) que les MMP2 et MMP9 sont surexprimées dans le carcinome rénal humain (*human renal cell carcinomas, RCCs*). Par ailleurs, Lein *et al* (101) ont montré que seul le niveau d'expression de MMP9 est augmenté dans les cellules tumorales, et que le niveau d'expression de MMP2 est comparable aux cellules normales. D'autre part, Walther *et al* (174), ont montré que le niveau d'expression de MMP2 est plus élevé dans les RCC par rapport aux cellules normales.

I.3.4.2.3 Prolifération

Une troisième étape de la progression tumorale dans laquelle les MMPs sont impliquées est la prolifération des cellules tumorales. Ceci est dû au fait que certaines MMPs, comme la stromélysine, sont capables de digérer des protéines extracellulaires qui séquestrent les facteurs de croissance. C'est le cas de l'IGFBP (*insulin-like growth factor binding protein 3*) qui se lie à l'IGF II (*insulin-like growth factor II*) (112, 179). Ceci conduit à la libération de ces facteurs de croissance d'une façon incontrôlée et à une augmentation de la prolifération cellulaire.

I.3.4.2.4 Angiogenèse

L'angiogenèse est la quatrième étape de la progression tumorale dans laquelle les MMPs y jouent un rôle. Certaines MMP augmentent la libération de facteurs angiogéniques comme le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (24).

TABLEAU III : LIENS ÉTABLIS ENTRE CERTAINS CANCERS ET MMPS

Organes touchés par le cancer	MMP	Références
Sein	MMP2,7,9,14	(175)
Poumon	MMP2,7,9	(37)
Ovaire	MMP2 et MMP14	(176)
Pancréas	MMP2,3,9et 14	(78)
Prostate	MMP2 et 14	(167)

1.3.5 RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ DES MMPs

À cause de leur importance pathophysiologique, l'activité des MMPs doit être finement contrôlée afin de la confiner en des endroits spécifiques (53). Cette régulation se fait à différents niveaux : transcription des gènes codant les MMPs, stabilisation des ARNm, traduction, sécrétion sous forme zymogène, liaison des pro-enzymes à la membrane et/ou aux molécules de la matrice extracellulaire, activation, inhibition par les TIMPs, dégradation. La régulation de l'expression des MMPs et la régulation de leur activité par les TIMPs seront décrites en détails car ces deux aspects sont davantage pertinents à cette étude.

1.3.5.1 Régulation de l'expression

En règle générale, les MMPs ne sont pas exprimées constitutivement *in vivo* mais sont induites en réponse à des cytokines, des facteurs de croissance, des hormones. Ainsi, la plupart des MMPs sont induites par l'IL-1 β , le TNF- α , le PDGF, le TGF- α , l'EGF, le HGF, le bFGF et le NGF (134). Ces effets s'expliquent en partie par la présence, dans la région 5'-flanquante de la partie codante du gène, de séquences cis-régulatrices de type AP-1 et/ou PEA3. Ces séquences stimulent la transcription du gène situé en aval lorsqu'elles sont liées au facteur trans-régulateur correspondant (complexe jun/fos pour le site AP-1 et c-ets pour le site PEA3) (116).

La portion de l'activation des MMPs dépendante de AP-1 peut être inhibée par les glucocorticoïdes ou l'acide rétinoïque (85).

A l'inverse des autres MMPs, la MMP-2 est exprimée constitutivement par de nombreux types cellulaires. L'organisation de la séquence promotrice du gène montre des différences notables avec celle des autres MMPs. Ce promoteur contient une boîte TATA non canonique et ne possède ni site AP-1 ni site PEA3 mais deux sites SP1 et un site de liaison à la p53 (26, 38).

La régulation de l'expression des MMPs est spécifique du type cellulaire et certains facteurs peuvent avoir des effets opposés sur des types cellulaires différents. C'est par exemple le cas du TGF β qui stimule la production de MMPs par les kératinocytes mais inhibe leur expression dans les fibroblastes (47, 165). D'autre part, l'expression des MMPs est dépendante de l'environnement péricellulaire, des interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire ainsi que de la forme de la cellule (151, 178).

I.3.5.2 Régulation par les inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs)

La famille des TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) comprend au moins 4 isoformes chez le rat, désignées sous les noms de TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, de masse moléculaire respective de 28, 21, 24 et 22 kDa (**Tableau IV**). Exprimés par de très nombreux types cellulaires, ils sont présents dans la majorité des tissus et des fluides de l'organisme. Si les TIMPs-1 et -2 sont présents sous forme soluble, le TIMP-3 est insoluble et lié à la matrice extracellulaire (99). Le TIMP-1 se distingue également par la forte glycosylation constitutive de sa chaîne polypeptidique, faisant passer la masse moléculaire de 20 kDa à 30 kDa. Une quatrième isoforme (TIMP-4) récemment découverte par clonage chez l'homme et la souris semble n'être significativement exprimée que dans le coeur (99). Un rôle spécifique de TIMP dans ce tissu est donc à envisager.

Ces inhibiteurs partagent une forte homologie de structure (entre 37 et 51%). Ainsi, ils comportent 12 résidus cystéine permettant la formation de 6 ponts disulfure qui organisent la molécule en deux domaines et sont responsables de la formation des

boucles impliquées dans la liaison avec l'enzyme. Ils forment avec les MMPs, des complexes équimolaires non covalents de haute affinité (66).

Plusieurs modes d'interaction entre TIMPs et MMPs semblent exister. L'interaction entre TIMP-1 et proMMP-9 ou entre TIMP-2 et proMMP-2 semble impliquer le domaine N-terminal de la molécule de TIMP et le domaine C terminal de la molécule de proMMP (16, 92). L'interaction entre TIMP et MMPs activées pourrait se faire par une liaison entre le TIMP et le site actif de la MMP (181). Elle peut également faire intervenir le domaine C-terminal des MMPs, comme cela a été montré pour la MMP-2 (54) et la stromélysine-1 (16).

Le rôle anti-protéasique des TIMPs peut s'exercer à plusieurs niveaux ; ils peuvent inhiber l'activation des formes zymogènes des MMP-2 et -9 en se complexant à elles, ils peuvent empêcher l'activation de la proMMP-2 en inhibant la MT1-MMP, par liaison avec sa forme active, ils peuvent également inhiber l'action catalytique exercée par les MMPs en se complexant avec leur forme active (18).

En plus des TIMPs qui sont des inhibiteurs spécifiques des MMPs, il existe également des inhibiteurs non spécifiques tels que l' α_2 -macroglobuline et d' α_1 -protéinase, capables de diminuer l'activité de ces protéases (67).

TABLEAU IV : Les inhibiteurs tissulaires des MMPs

Inhibiteur P M* (kDa)	proMMPs	Expression régulée par
TIMP-1 28	ProMMP-9	TGF-β, EGF, TNF-α Progestérone
TIMP-2 21	ProMMP-2	c-AMP, acide rétinoïque
TIMP-3 21-24	ProMMP2,9	TGF-β, PMA
TIMP-4 22	ProMMP-2	...

* P. M. : poids moléculaire. Tiré de (77).

I.4 LE HGF ET SON RÉCEPTEUR

Le facteur de croissance HGF et son récepteur, c-Met, sont exprimés dans le modèle cellulaire à l'étude, les cellules MSV-MDCK-INV. Une description détaillée de ces derniers sera ici donnée afin de faciliter ensuite la compréhension.

I.4.1 Le HGF/SF

L'*Hepathocyte Growth Factor* (HGF), connu aussi sous le nom de *Scatter Factor* (SF) est un polypeptide synthétisé principalement par les cellules d'origine mésenchymateuse et stromale, mais non par les cellules épithéliales. C'est un facteur de croissance ayant un rôle mitogénique, motogénique et morphogénique sur plusieurs types cellulaires (28, 60, 111, 140, 163).

Le HGF est synthétisé sous forme de pré-pro-HGF qui est converti en pro-HGF par une coupure intracellulaire (15) (**Figure 6**). Le pro-HGF (inactif) est alors sécrété de la cellule, et converti par des protéases dont l'uPA (*urokinase plasminogene activator*) (124) dans la matrice extracellulaire, en sa forme mature soit le HGF (actif).

Le HGF (**Figure 6**) mature est une protéine hétérodimérique composée de deux sous-unités, α (69kDa) et β (34kDa), liées entre elles par un pont disulfure entre les acides aminés Cys⁶⁰⁴ de la chaîne α et Cys⁴⁸⁷ de la chaîne β . La chaîne α contient dans sa partie N-terminale une boucle (*hairpin loop*) et quatre *kringle domains* (K1, K2, K3 et K4); la chaîne ressemble à une protéinase à sérine mais n'a pas d'activité protéolytique.

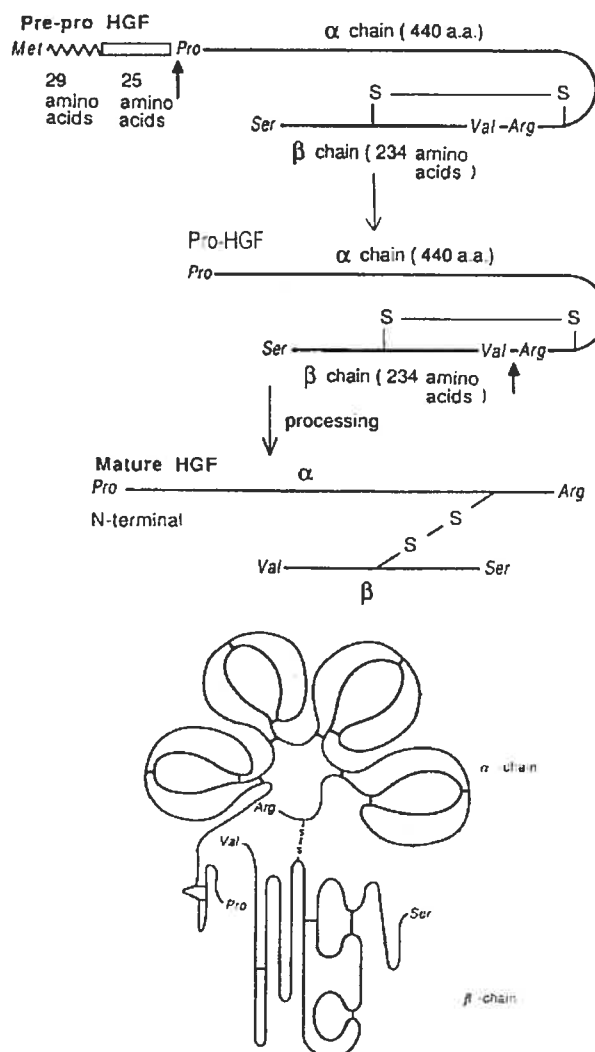


Figure 6 : Étapes impliquées dans la maturation du pré-pro-HGF en HGF mature, forme catalytiquement active. La structure secondaire du HGF mature est aussi montrée, laquelle est formée d'une sous-unité α de 69 kDa et sous unité β de 34 kDa. Tiré de (123).

1.4.2 LE RÉCEPTEUR HGF-R (c-Met)

Le récepteur HGF-R ou protéine c-Met, issu de la traduction du proto-oncogène *c-met* est le récepteur spécifique du ligand HGF. Il fait partie de la grande famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (64). c-Met est exprimé dans plusieurs types

cellulaires mais particulièrement dans les cellules épithéliales (43, 84) c-Met est une protéine hétérodimérique de 190 kDa. Elle est formée de deux chaînes, la chaîne α de 50 kDa et la chaîne β de 145 kDa, reliées entre elles par des ponts disulfure (32). Dans des conditions physiologiques, c-Met est phosphorylé sur les résidus tyrosine (autophosphorylation), en position 1234 et 1235, en réponse à son ligand, le facteur HGF/SF. Cette autophosphorylation induit ensuite la phosphorylation de deux résidus tyrosine en position 1349 et 1356 du site de liaison multifonctionnel, aussi appelé site d'ancrage (*docking site*) (Figure 7). Le récepteur phosphorylé (activé) peut alors interagir, via les tyrosine phosphorylées, avec les domaines SH2 de nombreux effecteurs ou adaptateurs, lesquels mènent à l'activation de différentes voies de signalisation. Ainsi, la phosphorylation des 2 résidus tyrosine du site d'ancrage (Y¹³⁴⁹ et Y¹³⁵⁶) du c-Met humain est essentielle à l'expression fonctionnelle du phénotype dit "invasif" du récepteur c-Met (69).

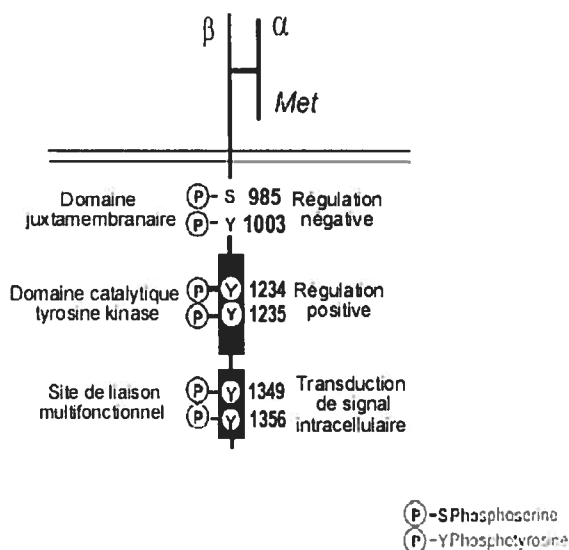


Figure 7: Le récepteur c-Met et ses sites de phosphorylation. Les différents domaines et résidus tyrosine pouvant être phosphorylés à la suite de l'auto-activation du récepteur c-Met ou, dans le cas de S⁹⁸⁵ et Y¹⁰⁰³, en conséquence de l'activation d'autres voies de signalisation intracellulaires, dont la protéine kinase C α (17).

I.4.3 IMPLICATION DU HGF ET DE SON RÉCEPTEUR DANS LE CANCER

En conditions physiologiques, l'activation de c-Met par le HGF entraîne une dissociation des contacts cellule-cellule menant à une croissance invasive, nécessaire au développement embryonnaire et au processus de cicatrisation et de régénération d'un tissu (56). Toutefois, l'activation non-régulée de l'oncogène c-Met confère aux cellules cancéreuses les propriétés d'invasion menant à la formation de métastases (17, 161). De nombreux cancers sont associés à une forte expression de c-Met, dont les cancers du sein (168), des ovaires (14), de la prostate (81), de la thyroïde (147), d'autres sont associés à une phosphorylation accrue de Met sur les acides aminés tyrosine (149).

I.5 TRANSFORMATION CELLULAIRE

De nombreux paramètres ou propriétés sont modifiées ou altérées dans les cellules transformées. Cependant, toute cellule transformée ne présente pas forcément toutes ces caractéristiques, mais plutôt un ensemble de modifications qui la rend bien distincte de la cellule normale dont elle est issue. Parmi ces paramètres on a identifié 1- l'immortalité (passages cellulaires d'une façon infinie), 2- la diminution de l'inhibition de croissance en rapport avec la densité cellulaire, 3- la perte de l'inhibition de croissance à confluence, 4- la diminution des besoins en milieu nutritif, notamment en sérum et en facteurs de croissance (auto-production de facteurs de croissance, modification des récepteurs), 5- la possibilité de croître dans des milieux semi-solides, 6- la perte de contrôle du cycle cellulaire (pas d'arrêt de la croissance en G1 ou G0 même en l'absence de facteurs de croissance), 7- l'expression accrue des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, 8- la modification des mécanismes de transmission du signal, 9- la résistance à l'apoptose, 10- un changement de morphologie cellulaire et 11- la perte de la capacité d'adhésion

I.5.1 Les cellules MSV-MDCK-INV

Les cellules MSV-MDCK-INV ont été sélectionnées à partir des cellules MDCK transformées par le virus de sarcome de Moloney (MSV-MDCK), pour leur capacité à passer à travers un filtre recouvert de Matrigel® (98). Elles sont

particulièrement intéressantes du fait qu'elles possèdent des caractéristiques de cellules épithéliales *transformées* et de cellules invasives.

I.5.1.1 Transformation des cellules par le virus du sarcome de moloney

Les cellules MDCK (*Madin-Darby Canine kidney*) sont des cellules épithéliales de rein de chien. Elles forment une monocouche de cellules polarisées reliées entre elles par des jonctions serrées (22). Ces cellules répondent très bien au HGF, de ce fait elles constituent un excellent modèle *in vitro* pour étudier les effets du HGF sur le changement de morphologie et le mouvement cellulaire. La lignée de cellules MDCK transformées par le virus MSV (*moloney sarcoma virus*), les cellules MSV-MDCK, a été obtenue chez American Type Culture Collection afin d'étudier le phénomène de transformation par ce virus des cellules épithéliales. Ces cellules transformées ont une morphologie différente des cellules parentales MDCK; elles ne forment pas de contacts cellule-cellule serrés, elles ont perdu leur forme cuboïdale et leur capacité à se polariser (22). De plus, les cellules MSV-MDCK ont un cytosquelette d'actine désorganisé, possèdent moins de fibres de stress comparativement aux cellules MDCK (98) (**Figure 8**) et ont une distribution différente de certaines protéines telles que la cadhérine E (médiateur de l'adhésion cellule-cellule) et ZO1 (*zona occludens 1*, protéine spécifique des jonctions serrées). La perturbation ainsi que la diminution de l'expression de ces protéines dans les cellules MSV-MDCK suggèrent qu'elles jouent un rôle important dans le maintien du phénotype épithélial des cellules MDCK ainsi que dans l'acquisition du phénotype invasif des cellules MSV-MDCK. Il a d'ailleurs été montré que les cellules MSV-MDCK sont plus motiles et invasives que les cellules MDCK (153, 172)

I.5.1.2 Sélection d'une population invasive

Les cellules MSV-MDCK ont étéensemencées dans la chambre supérieure des chambres d'invasion. Ces chambres d'invasion sont composées d'une chambre supérieure et d'une chambre inférieure séparée l'une de l'autre par un filtre poreux recouvert de Matrigel®. Le Matrigel® est une formule commerciale combinant différentes protéines de la matrice extracellulaire mais dont la composition exacte n'est

pas connue. Après 24h d'ensemencement les cellules qui ont réussi à passer à travers les pores de Matrigel® ont été décrochées de la surface inférieure du filtre par trypsination. Après avoir obtenu une quantité adéquate de cellules, celles-ci ont été à nouveau déposées sur un filtre pour une deuxième ronde de sélection. Après une troisième ronde, la lignée cellulaire homogène nommée MSV-MDCK-INV a été obtenue.

I.5.1.3 Caractéristique des cellules MSV-MDCK-INV

Les cellules MSV-MDCK-INV (**Figure 8**) ont des pseudopodes bien définis riches en actine β mais ne contiennent pas de fibres de stress (98). Elles ne font pas de contacts cellule-cellule car elles n'expriment pas la cadhérine E, laquelle est impliquée dans ces interactions (observations du laboratoire non-publiées). Nous avons montré que de nombreuses protéines sont hautement phosphorylées sur tyrosine, dans ces cellules, et tout particulièrement le récepteur c-Met (**Figure 8**) (172). Le niveau d'expression de c-Met est similaire dans les cellules MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV, ce qui suggère que ce récepteur est hautement phosphorylé, donc activé, seulement dans les cellules MSV-MDCK-INV au caractère invasif. De plus, nous avons montré que l'activation constitutive du récepteur dans les cellules MSV-MDCK-INV est due à une boucle autocrine, et que cette activation autocrine du récepteur est directement responsable de la formation des pseudopodes et du caractère motile des cellules MSV-MDCK-INV (172). Enfin, ces cellules forment, tout comme les cellules NIH3T3 transformées par l'oncogène *ras*, de grosses colonies en milieu semi-solide (agar mou) (Giusseppe Giannini et Josette Noël, non-publié).

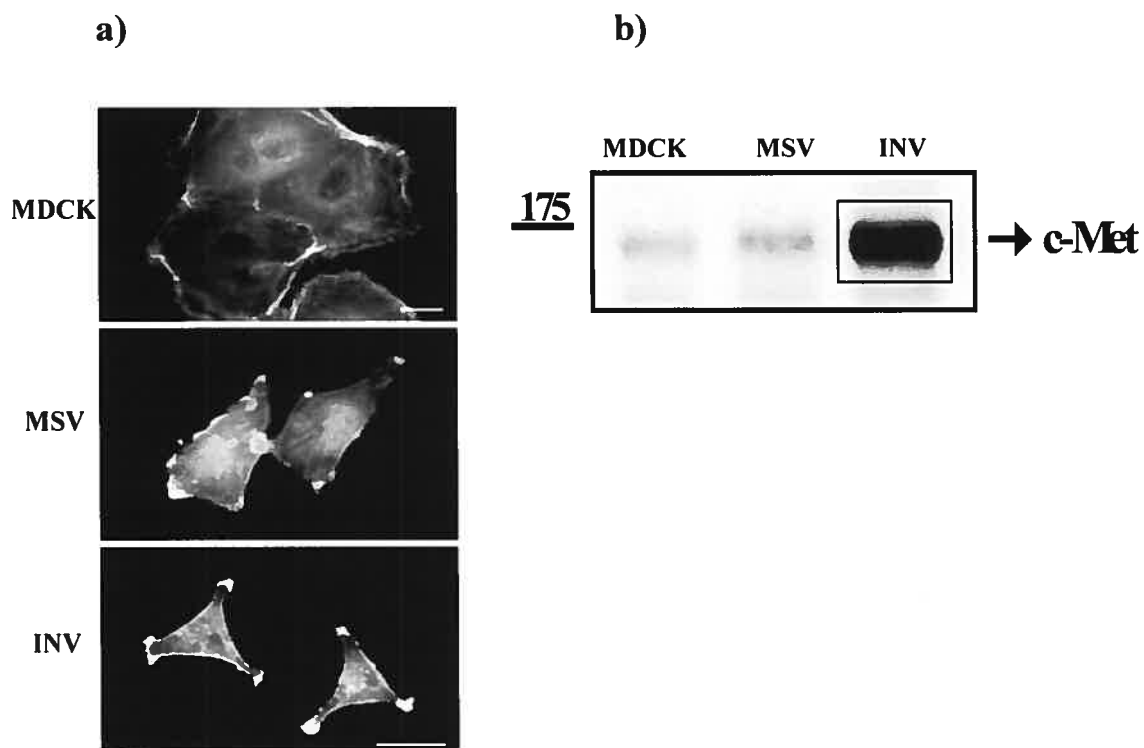


Figure 8 : a) Morphologie et organisation du cytosquelette d'actine dans les cellules MDCK, MSV-MDCK (MSV) et MSV-MDCK-INV (INV). Marquage de l'actine-F par la phalloïdine couplée au rouge Texan. La barre= 10 μ M. **b)** Immunobuvardage de type western avec un anticorps anti-phosphotyrosine. Adaptée de (172)

I.6 BUT DE L'ÉTUDE

Étant donné que les MMP2 et MMP9 sont impliquées dans le processus d'invasion et de progression tumorale, et que la stimulation par le HGF induit la synthèse et/ou sécrétion de certaines MMPs (87, 119, 177), le but que nous nous étions fixé était de déterminer l'identité des MMPs exprimées et sécrétées par les cellules MSV-MDCK-INV, et de comprendre leur rôle dans la motilité de ces cellules. Nous avons tenté d'évaluer, par la technique d'immunobuvardage de type Western, le niveau d'expression des MMP2,3,7,9 et 14 dans les lignées cellulaires MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV. Contrairement à nos attentes, aucune des ces MMPs n'est exprimée d'une façon significative dans les cellules MSV-MDCK-INV comparativement aux lignées parentales non invasives; les MSV-MDCK et les MDCK. Nous avons étudié également l'activité de MMP2 et 9 dans les lignées cellulaires MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV par la technique de zymographie. Aucune activité de la MMP2 ni de la MMP9 n'est détectée dans les cellules MSV-MDCK-INV. Cependant, l'utilisation d'un inhibiteur à large spectre des métalloprotéases montre, par la technique de la plaie, une diminution de la motilité de cellules MSV-MDCK-INV.

Ces résultats suggèrent que d'autres MMPs pourraient être impliquées dans le phénotype motiles des cellules MSV-MDCK-INV. Par ailleurs Jia et al ont récemment montré que ces cellules ont une très forte capacité à former des bourgeonnements (*blebs*), lesquels sont nécessaires au processus de migration cellulaire (184). Il est donc possible que la contribution des MMPs au phénomène de motilité des cellules MSV-MDCK-INV soit, à l'inverse de ce qui était attendu, très négligeable.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1 ANTICORPS ET RÉACTIFS

II.1.1 Réactifs de culture cellulaire

Le *Dulbecco's minimun essential medium* (DMEM), le *fœtal bovine serum* (FBS) la glutamine, les acides aminés non-essentiels, les vitamines, la pénicilline, la streptomycine et la trypsine ont été achetés chez Gibco Life Technologies (Burlington, ON).

II.1.2 Anticorps primaires et protéines recombinantes

Les anticorps polyclonaux dirigés contre les MMP2,9, l'anticorps anti-p125^{FAK} et l'anticorps anti-HGF ont été achetés chez la compagnie Santa Cruz Biotechnologie (Santa Cruz, CA). L'anti-TIMP2, les protéines recombinantes MMP2,9 (rMMP2,9) et TIMP2 (rTIMP2) proviennent de la compagnie Chemicon (Temecula, CA). L'anti-phospho-c-Met (Y^{1230,1234,1235}) provient de Biosource International (distribué par Mediacorp Inc, Montréal, Qc).

II.1.3 Anticorps secondaires

Les anticorps secondaires de chèvre et de lapin couplés à l'enzyme *horseradish peroxidase* (HRP) ont été obtenus de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA).

II.1.4 Autres

Le r-HGF (human recombinant hepatocyte growth factor), le TPA 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate et la gélatine proviennent de la compagnie Sigma (Saint Louis Missouri, USA). Le réactif ECL (*enhanced chemiluminescence*) a été obtenu de Mandel (St-Laurent, Qc) le réactif BCA (*bicinchoninic acid*) de Pierce Biotechnology Inc (Rockford, IL). La membrane de nitrocellulose Hybond-C Extra

de 45 microns provient de Amersham Life Science (Arlington Heights, IL). Le méthanol, l'acide acétique ainsi que le bleu de Comassie (*Brilliant Blue G-250*) ont été achetés de la compagnie Fisher Scientific (Nepean, ON). L'ilomastat provient de la compagnie Cederlan (Hornby, ON)

II.2 CULTURE CELLULAIRE

Les cellules HT-1080 (cellules épithéliales humaine de fibrosarcome), MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV sont mises en culture dans du milieu DMEM contenant du NaHCO_3 25 mM (DMEM- NaHCO_3) supplémenté de FBS 10%, d'acides aminés non-essentiels 10 mM, de glutamine 1 mM, de vitamines 10 mM, de pénicilline et de streptomycine sous une atmosphère de 5% CO_2 , à 37°C. Les cellules MSV-MDCK-INV ne doivent pas atteindre une confluence de plus de 70%. Lors de la division 3 fois par semaine, les cellules MSV-MDCK-INV, MSV-MDCK et HT-1080 sont rincées au PBS et incubées 40 secondes avec la trypsine 0.05%. Pour les cellules MDCK, lors de la division, elles sont rincées et incubées pendant 10 minutes avec le PBS et ensuite incubées 5 à 10 minutes avec la trypsine 0.5%. Les cellules sont ensuite comptées et ensemencées à une densité de 400 000 cellules (pour la préparation des lysats) par plat de 10 cm de diamètre à une densité de 800 000 cellules (pour les zymogrammes) par plat de 10 cm de diamètre et une densité de 300 000 cellules (pour la technique de la plaie) par plat de 65cm de diamètre.

II.3 IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN

II.3.1 Préparation des lysats cellulaires

Après une culture des cellules pendant deux jours, sur la glace, la monocouche de cellules est lavée deux fois avec du PBS-CM (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 2.7 mM, KH_2PO_4 2.7 mM, CaCl_2 0.1 mM et MgCl_2 1 mM) et 200 μL de tampon de lyse (PBS comprenant SDS 1%, EDTA 5 mM, orthovanadate de sodium 0.2 mM, glycérophosphate 40 mM et les inhibiteurs de protéases PMSF 0.1 mM, phénanthroline 0.1 mM, pepstatine 1 $\mu\text{g/ml}$, leupeptine 1 $\mu\text{g/ml}$, aprotinine 1 $\mu\text{g/ml}$)

est ajouté dans chaque plat. Les cellules sont grattées et l'ADN est brisé par deux rondes de sonication de 15 sec, force 2, au moyen d'un sonicateur Branson 450 (Danbury, CT), en maintenant le tube dans la glace pour éviter un réchauffement de l'échantillon. Les protéines sont récupérées à la suite d'une centrifugation de 30 minutes à 12 800 RPM à 4°C (les protéines se retrouvent dans le surnageant).

II.3.2 Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué avec le réactif à base d'acide bicinchoninique (BCA ; *bicinchoninic acid*) de chez Pierce (Rockford, IL). Ce composé permet de détecter et de quantifier les protéines totales par colorimétrie. Le Cu^{2+} est réduit en Cu^{1+} par les protéines en milieu alcalin. Le réactif BCA possède une haute sensibilité et affinité pour le Cu^{1+} . Ainsi, la détection colorimétrique (coloration mauve) est le produit de la chélation de deux molécules de BCA et d'un ion Cu^{1+} . Ce complexe soluble dans l'eau absorbe à une longueur d'onde de 562 nm de façon linéaire en fonction de la concentration en protéines. La concentration des protéines est toujours déterminée en référence à une courbe-étalon préparée en parallèle en utilisant la protéine *bovine serum albumin* (BSA). Dans des tubes, une série de concentrations de BSA est préparée (0, 2, 4, 6, 16, 32 $\mu\text{g/ml}$) pour la courbe-étalon ainsi que deux quantités différentes (3 et 5 μL) pour tous les échantillons de protéines à doser. Par la suite, 1 ml de réactif BCA est ajouté dans chaque tube et ceux-ci sont incubés 30 minutes à 37°C. Après l'incubation, les tubes sont laissés à la température de la pièce 10 minutes afin de laisser stabiliser la réaction puisque l'intensité de la coloration varie beaucoup moins en fonction du temps à cette température. À l'aide d'un spectrophotomètre, à la longueur d'onde de 562 nm, l'absorbance du blanc (sans protéine), des étalons et de tous les échantillons à doser est mesurée dans un délai de 10 minutes pour éviter des erreurs significatives dues au changement continu de couleur du réactif BCA. Les valeurs d'absorbance obtenues pour les étalons ainsi que leur concentration connue en protéines permettent d'établir une courbe de régression à partir de laquelle sont dérivés les paramètres permettant de déduire la concentration en protéines des échantillons inconnus (pente et ordonnée à l'origine).

II.3.3 Séparation des protéines sur un gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de *sodium dodécyl phosphate* (SDS) permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Des concentrations de 7.5% ou 12% acrylamide ont été utilisées. Tout d'abord, l'assemblage des vitres propres est effectué et le gel de séparation (Tris-HCl 375 mM pH 8.8, SDS 0.1 %, acrylamide 7.5 ou 12%, TEMED 0.1%, ammonium sulfate 0.1%) est coulé. Après une période de polymérisation de 15-30 minutes, le gel d'entassement (Tris-HCl 375 mM pH 8.8, SDS 0.1 %, acrylamide 4%, TEMED 0.1%, ammonium sulfate 0.05%) est coulé et un peigne de 15 puits est inséré entre les deux vitres. Les échantillons de protéines doivent être mélangés dans un ratio 2:1 à du tampon Laemmli 3X (β -mercaptoéthanol 15%, SDS 7.5%, glycérol 30%, Tris-HCL 300 mM pH 6.8 et bleu de bromophénol) pour dénaturer les protéines (la concentration finale des constituants du tampon Laemmli doit être de 1X). Environ 50 μ g de protéines de lysats cellulaires sont utilisées. Une fois les échantillons prêts, les puits sont chargés avec les échantillons, le tampon d'électrophorèse (Tris-base 25.2 mM, glycine 218.5 mM, SDS 0.1%) est ajouté et le système de gel *Hoefler* (gros gel) est assemblé. Les temps de migration et les voltages correspondants qui ont été utilisés sont indiqués dans le tableau suivant

Tableau V : Paramètres de migration et de transfert des protéines

	Migration	Transfert
1 gel	30 mA environ 4h	400 mA 4h
	5 mA O/N	100 mA O/N
2 gels	60 mA environ 4h	400 mA 4h
	10 mA O/N	100 mA O/N

V = volt ; mA = milliampère; O/N = *over night*

II.3.4 Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose

Une fois la migration terminée, la membrane de nitrocellulose Hybond-C Extra® ayant des pores de 45 μ est conditionnée au moins 10 minutes dans du tampon de transfert (glycine 120 mM, Tris-base 15.7 mM, pH 8.3). Le système de transfert est assemblé, la cuve est remplie avec du tampon de transfert et les protéines sont transférées sur la membrane de nitrocellulose selon les paramètres indiqués au **tableau 1**.

II.3.5 Révélation des protéines au Rouge Ponceau

Le rouge Ponceau est un colorant qui interagit avec les protéines de façon réversible. Cette coloration, réalisée sur chaque membrane de nitrocellulose immédiatement après le transfert, permet de distinguer toutes les bandes de protéines, et ainsi, évaluer la qualité du transfert et l'homogénéité du chargement en protéines dans les différents puits. La membrane est recouverte avec la solution de rouge Ponceau (rouge Ponceau 0.5%, acide acétique glaciaire 1%), puis agitée 2 à 3 minutes. Le rinçage avec de l'eau présentant une résistance électrique aux ions de 18.2 M Ω , i.e. pratiquement dépourvue d'ions, retire tout le colorant qui n'a pas interagit avec les protéines et révèle les nombreuses bandes de protéines transférées sur la nitrocellulose.

II.3.6 Immunodétection

Les protéines que l'on veut détecter sont révélées avec un anticorps primaire et un anticorps secondaire. Ces anticorps secondaires reconnaissent les immunoglobulines de lapin, de souris ou de chèvre ayant servi à reconnaître la protéine citée. Ces anticorps sont couplés à l'enzyme HRP (anti-IgG-HRP). Les incubations des membranes de nitrocellulose avec les anticorps sont réalisées selon un protocole établi pour chaque anticorps.

II.3.6.1 Western blot anti-phospho c-Met

Une attention toute particulière doit être portée pour la révélation de la forme phosphorylée de c-Met ; de nombreux lavages sont nécessaires pour assurer un résultat sans bruit de fond. La membrane de nitrocellulose est d'abord incubée 1 heure à 37°C dans du tampon de blocage (TBS *Tris Buffered Saline* , BSA 4%, Tween-20 0.05%) et par la suite, elle est incubée O/N à 4°C avec l'anticorps anti-phospho c-Met reconnaissant spécifiquement les résidus tyrosine phosphorylés en position 1230,1234 et 1235 (p-c-Met^{1230,1234,1235}) (1:20000 ; 0.025µg/ml) dilué dans le tampon TBS contenant la BSA 1%. À la température de la pièce, la membrane est rincée 6 fois pendant 10 minutes avec du tampon TBS contenant du Tween-20 0.1%, incubée 1 heure avec l'anticorps anti-IgG-HRP de lapin (1:5000 ; 0.08µg/ml) dilué dans le tampon TBS contenant de la BSA 2% et du Tween-20 0.1%. À la fin de l'incubation, la membrane est lavée 6 fois pendant 10 minutes avec du tampon TBS contenant du Tween-20 0.1% et lavée deux fois pendant 10 minutes avec du TBS.

II.3.6.2 Western blot anti-MMP2 et 9 et anti-TIMP2

La membrane de nitrocellulose est bloquée 1 heure avec du tampon de blocage (PBS *phosphate buffer saline*) contenant du lait écrémé 5%, Tween-20 (0.05%) et incubée O/N avec les anticorps anti-MMP2 ou 9 (1 :200; 0.5µg/ml) ou anti-TIMP2 (1 :1000; 0.5µg/ml) dilués dans du tampon de blocage. Par la suite, la membrane est lavée à la température de la pièce 6 fois pendant 10 minutes avec du tampon de lavage (PBS contenant Tween-20 0.05%) et incubée pendant 1 heure avec l'anticorps anti-IgG de chèvre-HRP (1 :1000; 0.01µg/ml) ou l'anticorps anti-IgG de lapin-HRP (1 :5000; 0.08µg/ml) dilués dans du tampon de blocage. Pour terminer, la membrane est lavée 6 fois pendant 10 minutes avec du tampon de lavage et lavée deux fois pendant 10 minutes avec du PBS.

II.3.6.3 Western blot anti-p125^{FAK}

Toutes les étapes suivantes sont effectuées à la température de la pièce. La membrane est bloquée pendant 30 minutes avec du tampon de blocage (PBS, lait 5%, Tween-20 0.05%) et incubée pendant 1 heure avec l'anticorps anti-p125^{FAK} (1/200 ; 0.4 µg/ml) dilué dans le tampon de blocage. La membrane est lavée, par la suite, à 3

reprises pendant 5 minutes avec du tampon de lavage (PBS, Tween-20 0.05%) et incubée pendant 1 heure avec l'anticorps anti-IgG-HRP de lapin (0.08 $\mu\text{g/ml}$) dilué dans du tampon de blocage. Pour terminer, la membrane est lavée 3 fois pendant 5 minutes avec du tampon de lavage et une fois avec du PBS seulement.

II.4 DÉCAPAGE (*STRIPPING*) DES ANTICORPS

L'enlèvement complet des anticorps primaires et secondaires de la membrane est possible mais doit être réalisé avec beaucoup de rigueur pour en assurer le succès. La température et la durée du traitement sont critiques. Lorsque maintenue dans d'excellentes conditions, la membrane peut être nettoyée des anticorps liés sans toutefois endommager ni perdre les protéines liées à la membrane de nitrocellulose. Il y a un grand avantage à utiliser cette procédure lorsque plusieurs protéines doivent être détectées dans un même échantillon et que la quantité de celui-ci est limitée. Nous vérifions l'efficacité du décapage par une exposition prolongée (de l'ordre de 30 min à 2 heures) contre un film avant d'amorcer une seconde hybridation. Pour effectuer ce décapage, la membrane doit être submergée et incubée dans un tampon comprenant du 2-mercaptoethanol 100 mM, SDS 2% et Tris-HCl 62.5 mM pH 6.7 pour une durée de 30 minutes à 50°C. Par la suite, la membrane est lavée deux fois avec un grand volume de PBS contenant du Tween 20 0.1% à la température de la pièce. La membrane peut alors être réutilisée immédiatement pour une autre immunodétection ou conservée à 4°C pour une utilisation ultérieure.

II.5 ZYMMOGRAPHIE

Les cellules ont étéensemencées dans le milieu DMEM complet en présence de sérum 10% et cultivées pendant 24 heure. Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec du milieu DMEM sans sérum et incubées dans le milieu sans sérum contenant le DMSO cellule témoin ou avec du TPA (100ng/ml). Après 24 ou 48 heure les milieux ont été récupérés dans des tubes à centrifugation, des inhibiteurs de protéases (aprotinine, leupeptine, pepstatine 1 $\mu\text{g/ml}$) sauf le phénantroline (inhibe l'activité des MMP) ont été ajoutés directement, et centrifugés pendant 5 min à 5000

rpm à la température de la pièce afin d'éliminer les cellules qui peuvent se retrouver dans les milieux.

Après avoir ajouté du tampon Laemmli 3X non-dénaturant (SDS 7.5%, Glycérol 30%, Tris-HCl pH 6.8, Bleu de bromophénol) à 100 μ l de ces milieux de culture pour faire une concentration finale de 1X, ceux-ci ont été utilisés pour quantifier l'activité gélatinolytique des MMPs présentes dans les milieux de culture i.e sécrétées par les cellules. Des aliquots de 100 μ l ont été soumis à une électrophorèse par gel de polyacrylamides-SDS (SDS-PAGE) contenant de la gélatine à 0.1 mg/ml. Les gels ont été lavés 2 fois pendant 30 minutes dans de l'eau ultra pure contenant du Triton X-100 2.5% pour enlever le SDS, rincés 2 fois dans de l'eau ultra pure, et trempés dans un tampon contenant NaCl 20mM, CaCl₂ 5mM, Brij-35 0.02%, et Tris-HCl 50mM (pH 7.4) pour 24 heure à 37⁰c, afin de réactiver les métalloprotéases ayant migré aux différents endroits du gel. Ces gels ont été par la suite colorés au Coomassie Brilliant Bleu R-250 dans du méthanol 30%, acide acétique 10% pendant environ 1 heure puis décolorés dans une solution de méthanol 30%, et acide acétique 10% pendant 1 heure, avec plusieurs changements de solution, jusqu'à ce que les bandes claires, dépourvues de gélatine, apparaissent clairement sur le fond bleu. Les MMP ont été identifiées d'après leur poids moléculaire et la position des protéines MMP recombinantes (rMMP) migrées en parallèle.

II.6 TECHNIQUE DE LA PLAIE

Cette technique est basée sur la capacité des cellules motiles à envahir une plaie pour permettre la fermeture de celle-ci. Les cellules HT1080 et MSV-MDCK-INV ont étéensemencées sur des lamelles à une densité de (300 000 cellules/plats 65mm) dans du milieu DMEM-NaHCO₃ en présence du sérum 10%. Après 24 h, les cellules ont été lavées deux fois avec du milieu DMEM-NaHCO₃ sans sérum, traitées avec de l'ilomastat 20 μ M pendant 24 h ou du DMSO (témoin). Après 24h du traitement à l'ilomastat, une rayure a été effectuée sur la monocouche de cellules à l'aide d'un tige

de pipetman (p200). Après 6 h, Les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 15 minutes et lavées 3 fois 10 minutes avec du PBS-CM filtré, et la capacité des cellules à envahir la plaie en fonction du temps a été observée au moyen d'un microscope Zeiss AxioSkop équipé d'un objectif 10X

Chapitre 3

Résultats

III. RÉSULTATS

L'identification des protéines spécifiques dans un lysat cellulaire repose sur la spécificité des anticorps utilisés et leur efficacité à détecter les protéines d'une espèce donnée. Le degré d'homologie entre des protéines homologues de différentes espèces dicte la possibilité de les reconnaître avec un anticorps dirigé contre une protéine d'une espèce donnée. Le choix des anticorps dépend ainsi toujours de l'espèce étudiée. Le modèle cellulaire à l'étude dans le laboratoire du Dr Josette Noël est d'origine canine. Très peu d'information quant au pouvoir de reconnaissance croisée des anticorps sur le marché est fournie envers les protéines de cette espèce. *A posteriori*, nous constatons que cet état de fait a beaucoup retardé et même énormément limité notre capacité d'étude des MMPs des cellules MDCK.

III.1 L'expression de la MMP2 est équivalente dans les cellules MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV

Notre premier objectif était d'évaluer le niveau d'expression des MMP2 dans les lignées cellulaires MDCK, MSV-MDCK (MSV) et MSV-MDCK-INV (INV). Des immunobuvardages de type Western ont été effectués. Les anticorps anti-MMP2 obtenus des compagnies (Santa Cruz Biotechnology et Chemicon) ont été testés à plusieurs reprises et avec différents protocoles et dilutions sur des lysats totaux. Avec les anticorps de la compagnie Santa Cruz, on détecte une seule bande correspondant au poids moléculaire des MMP2 (72/67kDa) (**Figure 9 A**). Par contre, avec les anticorps de la compagnie Chemicon, on détecte une bande intense de poids moléculaire (105kDa) nettement supérieur au poids moléculaire de la MMP2 (72/67kDa), répertorié dans la littérature. L'identité de cette bande est discutée dans la (**section III.1.1**). Quelques autres bandes d'intensité nettement moindre sont également observées dont une bande de poids moléculaire identique à la MMP2, principalement dans les cellules MDCK. Pour le reste des expériences, nous avons utilisé les anticorps de la compagnie Santa Cruz qui semblent être plus efficaces pour l'espèce canine.

Contrairement à ce qu'on attendait, le niveau d'expression de la MMP2 est équivalent dans les cellules MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV. Cependant, comme le niveau d'activité d'une protéine n'est pas toujours proportionnel à son niveau d'expression dû à des modifications post-traductionnelles, il demeure possible que la MMP2 soit plus active dans les cellules MSV-MDCK-INV.

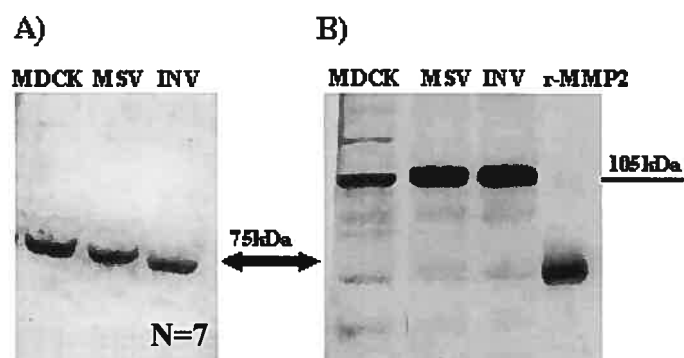


Figure 9: Expression de la MMP2 dans les cellules MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV. Le niveau d'expression de la MMP2 a été évalué par immunobuvardage de type Western sur des extraits protéiques (50µg), avec un anticorps anti-MMP2 (0.5 µg/ml) de la compagnie Santa Cruz (A) et de la compagnie chemicon (B). L'anticorps a été incubé pendant 17-20 heures à 4°C. Les extraits protéiques ont été mélangés avec le tampon Laemmli dénaturant et séparés sur un gel SDS- PAGE 7.5% acrylamide

III.1.1 La bande de haut poids moléculaire (~105kDa) ne correspond pas au complexe MMP2/TIMP2

Il est connu que MMP2 et TIMP2 forment un complexe (86). On s'est demandé si la bande de haut poids moléculaire (~ 105kDa), détectée avec l'anticorps anti-MMP2 de la compagnie Chemicon, correspondait à ce complexe. En effet, des complexes de dimères ou oligomères sont parfois observés même en présence de SDS et de β -mercaptoéthanol. C'est le cas pour des protéines membranaires tels les échangeurs Na^+/H^+ NHE1 et NHE3 (49). Pour vérifier ceci, des lysats totaux (50µg protéines) des trois lignées cellulaires ont été préparés et des immunobuvardages de type Western ont été effectués avec un anticorps spécifique anti-TIMP2 (**Figure 10**). Nous avons utilisé les cellules cancéreuses HT1080 comme témoin positif car il est connu (156) que ces

cellules expriment TIMP2 et MMP2. De plus, les protéines d'origine humaine, contre lesquelles sont dirigés les anticorps anti-TIMP2 et anti-MMP2, constituent un excellent témoin pour vérifier la spécificité des anticorps.

L'anticorps TIMP2 utilisé reconnaît, tout comme l'anticorps MMP2 de chez Chemicon, une bande à 105 kDa cependant il ne reconnaît pas le monomère TIMP2 dans les lignées canines MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV. Une bande au poids moléculaire de TIMP2 (~ 21kDa) a été détectée uniquement dans les cellules HT1080. Comme on ne peut pas détecter le monomère TIMP2 dans les cellules MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV, la bande de haut poids moléculaire ne correspond probablement pas au complexe MMP2/TIMP2. Bien que très intense et d'intensité différente dans les trois lignées cellulaires, cette bande représente probablement une bande non spécifique. Une autre bande à ~40kDa est détectée également avec cet anticorps dont l'identité est complètement inconnue.

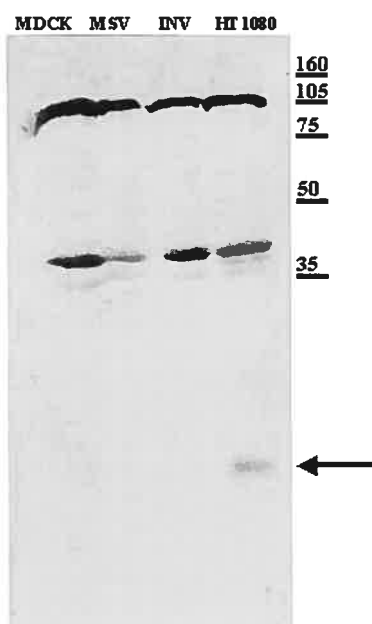


Figure 10: Expression de la TIMP2 dans les cellules MDCK, MSV-MDCK (MSV) MSV-MDCK-INV (INV) et HT1080

Le niveau d'expression de la TIMP2 a été évalué par immunobuvardage de type Western sur des extraits protéiques (50µg), avec un anticorps anti-TIMP2 (0.5 µg/ml) de la compagnie Chemicon. L'anticorps a été incubé pendant 17-20 heure à 4°C. Les extraits protéiques ont été mélangés avec du tampon Laemmli dénaturant et séparés sur un gel SDS-PAGE 10%.

III.2 L'expression de la MMP9 est équivalente dans les cellules MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV

Il est connu depuis longtemps que la MMP9 est souvent plus active dans les cellules cancéreuses, et que son niveau d'expression est plus élevé par rapport aux cellules normales (non cancéreuses) (1, 103, 114). Le fait que les cellules MSV-MDCK-INV représentent un modèle de cellules tumorales nous a incité à regarder le niveau d'expression de la MMP9 dans ces cellules et son activité (**section III2.1.1**), en les comparant aux cellules parentales (non tumorales) desquelles elles dérivent; les cellules MDCK et les cellules MSV-MDCK. Les expériences d'immunobuvardage effectuées sur des lysats cellulaires totaux ont montré que le niveau d'expression de la protéine MMP9 est équivalente dans les trois lignées cellulaires étudiées (**Figure 11**). Ces résultats étaient inattendus.

Pour s'assurer que ce que l'on détecte est la protéine MMP9, nous avons stimulé les cellules avec un ester de phorbol, le TPA (*12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate*), et suivi le niveau d'expression de la MMP9 (**Figure 12**).



Figure 11: Expression de la MMP 9 dans les lignées cellulaires MDCK, MSV-MDCK (MSV) et MSV-MDCK-INV (INV). Le niveau d'expression de la MMP9 a été évalué par immunobuvardage de type Western sur des extraits protéiques (50µg), avec un anticorps anti-MMP9 (0.5 µg/ml) de la compagnie Santa Cruz. L'anticorps a été incubé pendant 17-20 heure à 4°C. Les extraits protéiques ont été mélangés avec de laemmlli dénaturant et séparés sur un gel SDS-PAGE 7.5%.

III.2.1 Le TPA stimule la maturation de la MMP9 dans les cellules MDCK

L'absence de différence d'intensité de la bande détectée avec l'anticorps anti-MMP9 dans les 3 lignées cellulaires à l'étude nous ont poussés à étudier l'effet du TPA sur le niveau d'expression et/ou maturation de la MMP9 afin de vérifier la spécificité de reconnaissance de l'anticorps. En effet, la littérature rapporte que le TPA stimule la synthèse, et/ou la maturation (164) ainsi que la sécrétion (138) de la MMP9. Nous attendions donc une telle modulation par le TPA si la bande détectée est spécifique. On observe une petite augmentation de l'expression de la MMP9 par le TPA dans les cellules MDCK mais non dans les cellules MSV-MDCK ni les cellules MSV-MDCK-INV, et une maturation de MMP9 (pro-MMP9/MMP9) seulement dans les cellules MDCK. En effet des bandes de poids moléculaire plus faibles sont spécifiquement détectées par l'anticorps suggérant que celui-ci détecte des formes matures en plus des pro-formes.

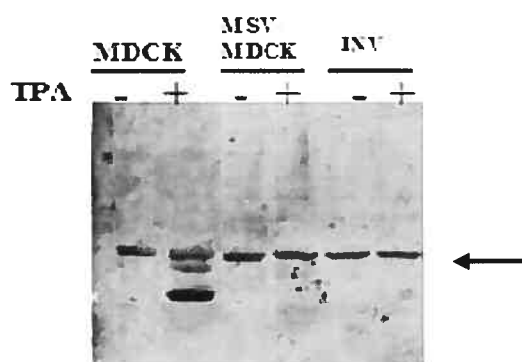


Figure 12: Effet de la stimulation par le TPA sur l'expression et la maturation de la MMP9. Les cellules ont été cultivées en présence de FBS 10% pendant 24 heures. Les cellules ont été ensuite lavées deux fois avec du milieu sans sérum et stimulées avec le TPA (100ng/ml) dans du milieu sans sérum pour 24 heures. La protéine MMP9 a été détectée par immunobuvardage de type Western avec un anticorps anti-MMP9 (0.5 µg/ml) de la compagnie Santa Cruz. L'anticorps a été incubé pendant 17-20 heures à 4⁰C. Les lysats totaux (50µg de protéines) ont été mélangés avec le tampon Laemmli dénaturant, et les protéines ont été séparées sur un gel de SDS-PAGE 7.5%.

III.3 La MMP9 est plus active dans les cellules MDCK

La technique de zymmographie est utilisée pour mesurer l'activité enzymatique des métalloprotéases. Dans un premier temps, les milieux des cellules MDCK, MDCK-MSV, MDCK-MSV-INV et HT1080 ont été séparés sur un gel d'acrylamide 10% dans lequel nous avons incorporé de la gélatine à une concentration de 0.1%. Rappelons que la gélatine est une forme dénaturée du collagène, et qu'elle est dégradée principalement par les gélatinases soit les MMP2 et les MMP9. L'activité des métalloprotéases est évaluée sur les milieux cellulaires et non pas sur des lysats car les MMP solubles (non membranaires) sont sécrétées sous la forme de pro-enzyme (zymmogène) dont l'activation a lieu dans le compartiment extracellulaire par l'action d'autres protéases (**Figure 3**)

Rappelons que l'on prive les cellules de sérum pour éliminer toutes les protéases qui peuvent être présentes dans le sérum, et qui peuvent participer à l'activation des métalloprotéases d'une façon exogène.

Contrairement à ce que nous attendions, on n'observe aucune activité de la MMP2 ni la MMP9 dans les cellules MDCK-MSV-INV dans ces conditions (**Figure 13 A**). Dans les cellules MDCK, MSV-MDCK et HT1080, nous observons une bande qui correspond à la MMP9. La MMP9 semble être plus active dans les cellules MDCK comparativement aux cellules MSV et, d'une façon surprenante, elle est plus active que la MMP9 des cellules cancéreuses HT1080. L'activité de la gélatinase A, soit la MMP2, est détectée uniquement dans les cellules HT1080.

Nous avons par la suite, stimulé les cellules avec le TPA pour voir si ce dernier induit l'expression de la MMP9 dans nos lignées cellulaire comme c'est reconnu dans la littérature (183). Des résultats inattendus mais intéressants ont été obtenus (**Figure 13 B**) ; l'activité MMP9 des cellules MDCK-MSV-INV n'est pas détectable en absence ou en présence de TPA après 24 h de stimulation. Tel qu'attendu, le TPA stimule la synthèse et la maturation des MMP9 dans les cellules MDCK, MSV-MDCK et HT1080.

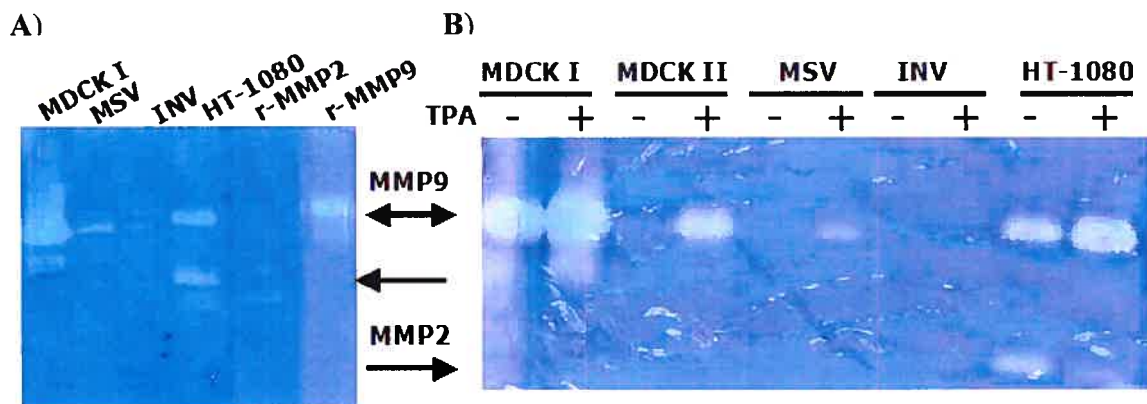


Figure 13: Activité gélatinase mesurée par zymographie sur les milieux conditionnés. Les cellules ont été ensemencées en présence de sérum et cultivées pendant 24 h puis lavées deux fois avec du milieu sans sérum et déprivées de sérum pendant 24 h (A) ou stimulées avec 100ng/ml TPA dans du milieu sans sérum (B). Les milieux ont été récupérés en présence d'inhibiteurs de protéases à une concentration de 1µg/ml. Du tampon Laemmli non-dénaturant 3x a été ajouté à 100µL de milieux conditionnés. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE contenant de la gélatine à une concentration de 0.1%. Les métalloprotéases ont été identifiées selon leur poids moléculaire et la position des rMMPs

III.4 Relation entre l'expression de la MMP2 et l'activation de c-Met par son ligand, le HGF

Le rôle du rHGF dans la maturation et l'augmentation de l'expression de certaines métalloprotéases (MMP2,3,9,14) dans plusieurs lignées cellulaires a été bien démontré (119, 177). Étant donné que les cellules MSV-MDCK-INV sécrètent le HGF d'une façon constitutive, il nous a semblé important de déterminer si l'activation de c-Met corrèle avec une forte expression de MMP2 dans ces cellules. Pour ce faire, nous avons, d'une part, stimulé les cellules MDCK et MSV-MDCK avec le rHGF et, d'autre part, récupéré le milieu d'incubation des cellules MSV-MDCK-INV en présence de (αHGF) pour titrer le HGF à mesure qu'il est sécrété par les cellules. On sait que le HGF, ajouté de façon exogène, induit la phosphorylation de c-Met dans les cellules

MDCK et MSV-MDCK (172). Nous avons donc regardé le profil de phosphorylation de c-Met et le niveau d'expression de la MMP2 correspondant. Les résultats obtenus et présentés à la **(Figure 14)** montrent que le HGF induit une phosphorylation de son récepteur c-Met dans les lignées cellulaires MDCK et MSV-MDCK, et que cette phosphorylation corrèle avec une augmentation de l'expression de la MMP2. De façon étonnante, l'expression de la MMP2 ne corrèle pas avec le degré de phosphorylation de c-Met dans les cellules MSV-MDCK-INV. Afin de confirmer l'uniformité des quantités de protéines séparées par électrophorèse SDS-PAGE, un immunobuvardage anti-FAK a été réalisé, étant donné que cette protéine est exprimée en grande quantité dans les cellules étudiées. Pour une même lignée, les quantités détectées sont tout à fait comparables dans tous les puits, confirmant les observations de la coloration au rouge Ponceau où des quantités uniformes de protéines étaient détectées dans chaque puits.

Ces résultats suggèrent que les voies de signalisation menant à l'expression de la MMP2 ne sont pas régulées de la même façon, ou même, seraient différentes pour les lignées MDCK, MSV-MDCK *versus* la lignée MSV-MDCK-INV.

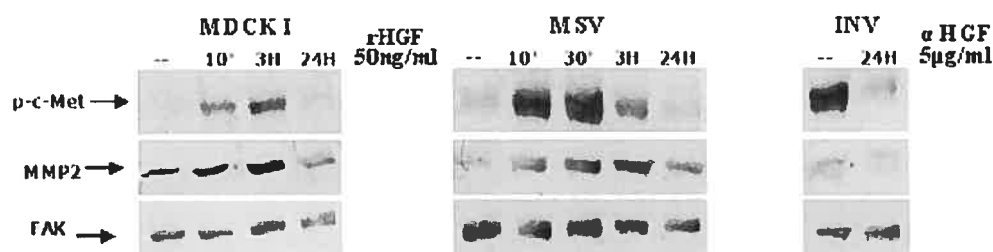


Figure 14: Effet du rHGF et de l'anti HGF (α -HGF) sur le degré de phosphorylation de c-Met et le niveau d'expression de MMP2

Le degré de phosphorylation de c-Met et le niveau d'expression de la MMP2 dans les lignées cellulaires MDCK et MSV-MDCK stimulées au HGF (50ng/ml) pendant 10', 30', 3H ou 24H et dans la lignée MSV-MDCK-INV traitée avec l' α -HGF (5μg/ml) pendant 24 H ont été étudiés par immunobuvardage de type western avec les anticorps anti-phospho-c-Met ($Y^{1230,1234,1235}$) et anti-MMP2. Le niveau d'expression de la FAK a été évalué, avec l'anticorps anti FAK, sur la membrane ayant servi à révéler la MMP2 après décapage des anticorps primaires et secondaires.

III.5 Expression de la MMP3, la MMP7 et la MMP14

Les résultats inattendus obtenus avec les MMP2 et 9 nous ont poussés à regarder d'autres MMPs pouvant être impliquées dans le caractère motile des cellules MSV-MDCK-INV. En se basant sur les MMPs connues dans la littérature comme étant impliquées dans des phénotypes tumoraux, nous avons tenté d'évaluer le niveau d'expression des MMP3 et 7. Il a en effet été montré (13, 42) que dans les *desmoid tumour* et dans le cancer de l'utérus, le niveau d'expression de ces MMPs varie en fonction de l'invasion tumorale. Les seuls anticorps anti-MMP3 et anti-MMP7 disponibles sur le marché sont ceux dirigés, surtout, contre les MMPs de l'espèce humaine. Nous avons tenté de détecter ces MMPs dans nos lignées cellulaires canines. Toutefois, aucune bande n'a pu être détectée, même avec l'utilisation de différents protocoles et dilutions des anticorps et après des expositions des films prolongées. La spécificité des anticorps testés a donc constitué un obstacle majeur à cette caractérisation plus poussée de sorte qu'on n'a pu tirer aucune conclusion concernant l'expression de ces MMPs dans les cellules MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV.

Pour ce qui est de la mesure de leur activité, la technique de zymmographie ne peut pas être utilisée car, contrairement aux gélatinases (MMP2 et 9) dont le substrat est la gélatine, les substrats des MMP3 et 7 sont respectivement le protéoglycan et la fibronectine. Or ces substrats ne peuvent pas être incorporés dans le gel SDS-PAGE.

Comme la métalloprotéase membranaire MMP14 (ou MT1-MMP) joue un rôle essentiel dans l'activation de la MMP2 (**Figure 4**) et que cette MMP est concentrée dans les lamellipodes et les pseudopodes des cellules *RPM17951 human melanoma cells* (121), et dans les lamellipodes des ostéoclastes (146), nous avons également tenté de la détecter dans nos lignées cellulaires. Une fois de plus, différents anticorps utilisés provenant des compagnies Santa Cruz Biotechnology et Chemicon ont été testés à plusieurs reprises. Cependant, aucun des anticorps testés n'a reconnu la MMP14 dans nos lignées canines (résultats non présentés). Afin de confirmer ces résultats nous avons testé les anticorps sur des lysats de cellules humaine *U87 glioma cell* (utilisé comme témoin positif) transfectées avec le cDNA codant pour la MMP14. Ces lysats cellulaires ont été fournis par le Dr Borhane Annabi de l'UQAM. Les anticorps dirigés

contre la MMP14 détectent, comme prévu, la MMP14 recombinante d'origine humaine, mais ne détectent aucun signal dans nos 3 lignées canines sur la même membrane de nitrocellulose. Ceci confirme la spécificité de ces anticorps pour l'espèce humaine uniquement.

Nous ne pouvons donc pas conclure quant au niveau d'expression de la MMP14 (ou MT1-MMP) dans les cellules MSV-MDCK-INV tumorales et invasives comparativement aux lignées parentales MDCK et MSV-MDCK transformées.

III.6 Inhibition des métalloprotéases par l'ilomastat

Le fait que les MMP2 et 9 sont faiblement exprimées ou absentes dans les cellules MSV-MDCK-INV et que leur activité ne peut être détectée suggère fortement que ces MMPs ne sont pas impliquées dans le caractère invasif des cellules MSV-MDCK-INV. Aucune conclusion concernant les MMP3,7 et 14 ne peut être tirée en raison du manque d'anticorps spécifiques contre ces protéines dans les lignées canines. Cependant, d'autres membres de cette grande famille pourraient jouer un rôle dans le phénotype motile de ces cellules. Comme il nous était impossible de regarder les 20 autres métalloprotéases dans le cadre de ce travail (temps et coût associés vu les problèmes récurrents de reconnaissance par les anticorps disponibles), nous voulions utiliser des inhibiteurs pharmacologiques afin d'inhiber leur activité. En effet, plusieurs inhibiteurs sont réputés avoir une action inhibitrice vis-à-vis de plusieurs membres de la famille des MMPs. Cependant, les très bons inhibiteurs sont déjà en phase d'essais cliniques et/ou non-disponibles commercialement (Marimastat, Batimastat) (79). Plus récemment, nous avons été conseillés par le Dr Borhane Annabi, un spécialiste dans le domaine des MMPs (4-11, 61, 62, 97), d'utiliser un inhibiteur à large spectre et disponible sur le marché. L'ilomastat (*N-[(2R)-2-(hydroxamidocarbonylmethyl)-4-methylpentanoyl]-L-tryptophan methylamide*) aussi connu sous le nom de *galardin* a été, à l'origine, synthétisé comme un inhibiteur des collagénases présentes dans la peau humaine (68). Ce composé inhibe les MMP-1, -2, -3, et -9 (2, 74). L'ilomastat a donc été utilisé pour avoir une idée générale, à savoir si plusieurs autres MMPs peuvent être impliquées dans la motilité des cellules MSV-MDCK-INV.

III.6.1 L'ilomastat diminue l'activité de la MMP2 dans les cellules HT1080 seulement

Comme l'ilomastat inhibe l'activité des MMPs, et non leur synthèse, nous avons mesuré uniquement l'activité gélatinase des MMPs sécrétées par zymmographie. Les cellules MDCK et MSV-MDCK-INV, mais aussi les cellules HT1080 utilisées comme témoin positif, ont été traitées avec une concentration d'ilomastat de 20 μ M en absence de sérum, et les milieux conditionnés ont été récupérés après 24-48h. Cette concentration a été choisie sur la base des expériences rapportées dans la littérature (11). L'activité gélatinase, mesurée par zymmographie, sur des cellules MDCK, HT1080 et MSV-MDCK-INV après 24-48 h (**Figure 15**) montre que l'ilomastat ne semble pas avoir un effet important sur l'activité de la MMP9 dans les cellules MDCK ni dans les cellules MSV-MDCK-INV.

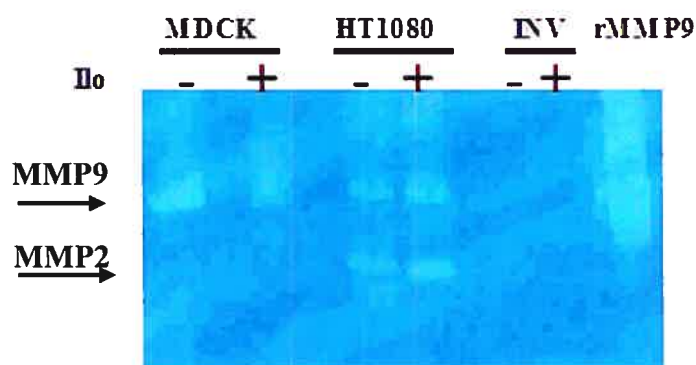


Figure 15: Activité gélatinase en présence et en absence d'ilomastat, mesurée par zymmographie sur les milieux conditionnés.

Les cellules ont étéensemencées en présence de sérum et cultivées pendant 24 H. Les cellules ont été lavées deux fois avec du milieu sans sérum, puis traitées avec 20 μ M ilomastat pendant 24 H. Les milieux ont été récupérés en présence d'inhibiteurs de protéases (1 μ g /ml). Les milieux ont ensuite été mélangés avec le tampon Laemmli non-dénaturant et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE 10 % contenant de la gélatine à une concentration de 0.1%. Les métalloprotéases ont été identifiées selon leur poids moléculaire et la position des rMMP9.

La **figure 15** montre clairement que, par rapport aux cellules témoins (-Ilomastat), l'ilomastat réduit de façon importante l'activité de la gélatinase A (MMP2) dans les cellules HT1080. En effet, la bande correspondant à la forme active (mature) de plus faible poids moléculaire a complètement disparu alors que la bande correspondant à la forme immature est plus intense. Ceci indique que l'ilomastat a inhibé la maturation de la MMP2. Cependant l'effet de l'ilomastat sur l'activité MMP9 est difficilement détectable; aucune différence d'activité de MMP9 des cellules témoins (-Ilomastat) vs cellules traitées (+Ilomastat) n'est observée dans les trois lignées cellulaires étudiées.

On peut conclure que les conditions utilisées, soit un traitement des cellules à l'ilomastat 20 μ M pour 24-48 heures, permettent de détecter une inhibition de l'activité des MMPs puisqu'une inhibition est observée pour les MMPs des cellules HT1080. Ces conditions ont donc été reprises pour étudier l'effet de l'ilomastat sur la motilité des cellules dont les cellules MSV-MDCK-INV (**section III.4.2**).

III.6.2 L'ilomastat inhibe partiellement la motilité des cellules MSV-MDCK-INV.

La technique de guérison de plaie (*wound healing assay*) est utilisée pour mesurer l'habilité des cellules à se déplacer dans une direction donnée. Les cellules MSV-MDCK-INV et les cellules HT1080 ont étéensemencées à haute densité sur une lamelle. Après 24 heures d'ensemencement, les cellules ont été lavées deux fois avec du milieu sans sérum pour éliminer toute source exogène de protéases et incubées 24 heures en présence de DMSO (cellules témoins) ou Ilomastat 20 μ M. Une rayure a été effectuée par la suite sur la monocouche de cellules et la capacité des cellules à envahir la plaie a été observée en fonction du temps. On observe à la **figure 16** que la capacité des cellules MSV-MDCK-INV et des cellules HT1080 à envahir la plaie est moindre à la suite d'un traitement à l'ilomastat comparativement au témoin DMSO. Ceci nous suggère que les cellules MSV-MDCK-INV sécrètent des métalloprotéases qui favorisent leur déplacement, et que le traitement à l'ilomastat ralentit le déplacement de cellules en inhibant ces métalloprotéases. Donc il y a certainement, parmi les 25 membres de la famille des métalloprotéases, des métalloprotéases impliquées dans la motilité des cellules MSV-MDCK-INV. Toutefois les métalloprotéases étudiées dans le

cadre de ce travail soit les MMP2 et 9 ne semblent pas l'être. Il faut quand même noter que bien que non quantifiée précisément, l'inhibition par l'ilomastat de la capacité des cellules MSV-MDCK-INV à refermer la plaie est faible comparativement à celle obtenue par exemple, par l'inhibition des voies de signalisation PI3kinase (environ 35 %) et ERK1/2 (environ 25 %) (résultats du laboratoire en préparation pour fin de publication). Ceci suggère que la contribution des MMPs à la capacité motile globale des cellules MSV-MDCK-INV est faible.

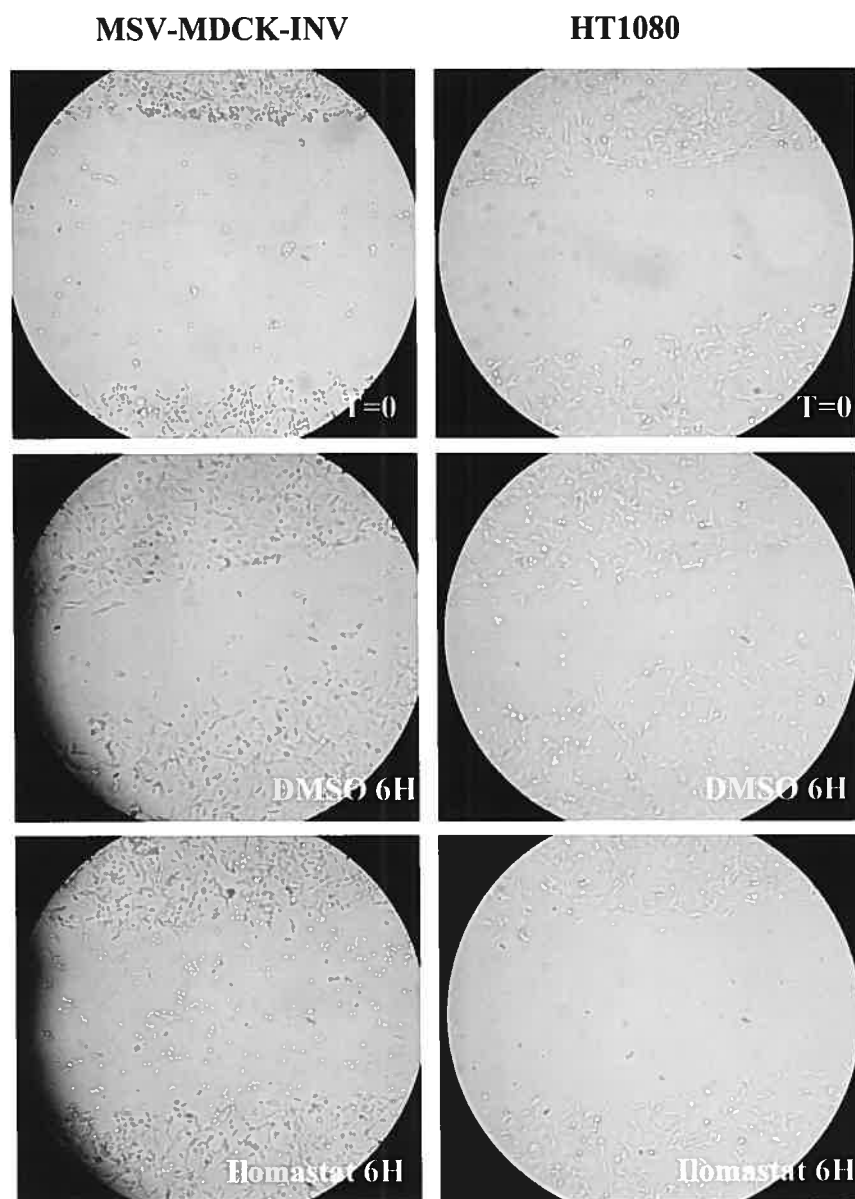


Figure 16: Effet de l'inhibition des métalloprotéases par l'ilomastat sur la motilité des cellules MSV-MDCK-INV et les cellules HT1080.

La capacité d'invasion des cellules a été mesurée par la technique de la plaie. Une rayure a été effectuée sur la monocouche de cellules et la capacité des cellules traitées à l'ilomastat 20 μ M à envahir la plaie été observée en fonction du temps. Ces traitements ont été effectués en absence de FBS. Une rayure au temps 0 a été photographiée pour fin de comparaison.

Chapitre 4

Discussion

IV. DISCUSSION

IV.1 La MMP2 est exprimée également dans les cellules MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV

Le caractère métastatique des cellules tumorales, dépend principalement de leur capacité à dégrader la matrice extracellulaire par des protéases (89) et dépend aussi de leur capacité motile intrinsèque. Une expression élevée de la MMP2 est souvent liée au caractère tumoral des différents types de cellules cancéreuses (1, 57)

Un effet stimulateur du HGF/SF sur la synthèse de MMP2 a été rapporté dans les cellules rénales humaines (65), dans les cellules de carcinome de colon (*colon carcinoma cell lines*) (170) et dans les cellules de carcinome de la vessie (*Gallbladder carcinoma cell lines*) (102). Cependant, dans ces 3 études, le mécanisme d'action par lequel le HGF stimule la synthèse de la MMP2 n'a pas été fermement établi. La région 5' flanquante du gène *mmp2* est différente des autres MMPs : il n'y a ni la boîte TATA (5'-TATAAAAG-3'), ni le site AP-1 (*activator protein-1*) dans le promoteur de MMP2 (41). Cependant, Hamasuna et al (72) montrent que l'effet stimulateur du HGF sur la synthèse de MMP2 dans les cellules U251 implique une activité tyrosine kinase, et donc probablement une augmentation de la phosphorylation sur des résidus tyrosine, car un pré-traitement des cellules avec un inhibiteur des protéines à activité tyrosine kinase (l'herbimycin A) inhibe complètement l'effet du HGF/SF sur l'expression de MMP2. Comme le HGF/SF agit spécifiquement sur c-Met, il est fort probable que la modulation de la synthèse de MMP observée dans cette étude soit dû à la cascade HGF/SF - c-Met - activité tyrosine kinase.

Nous avons montré que dans notre lignée de cellules invasives sécrétant le HGF de façon constitutive, la MMP2 n'est pas exprimée de façon significative comparativement aux cellules parentales non invasives, les cellules MDCK et MSV-MDCK. En effet, des immunobuvardages effectués sur les lysats de cellules MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV ne montrent aucune différence d'intensité de la bande correspondant à la MMP2 exprimée entre ces trois lignées (**Figure 9, p66**).

Silberman et al. ont proposé que l'expression de la MMP2 passe via les voies de signalisation Ras et PI3-Kinase (152) (**Figure 17**). Ceci ne peut malheureusement pas

expliquer l'absence d'augmentation de l'expression de la MMP2 dans les cellules MSV-MDCK-INV car, en présence de sérum (condition utilisée pour la culture des cellules en vue de la préparation des lysats cellulaires ayant servi aux immunobuvardages), l'activité de la voie PI3-Kinase, telle qu'estimée par la mesure du degré de phosphorylation de Akt, est même plus grande pour ces cellules que pour les cellules MDCK et MSV-MDCK (résultats du laboratoire, non-publiés). De même, la voie ras-ERK est constitutivement active dans les cellules INV car même après avoir privé de sérum nos cellules pendant 24 heures, MEK1/2 et ERK1/2 sont pleinement phosphorylées sur les résidus Ser 217/221 et Thr202/Tyr204, respectivement, témoignant d'une forte activité. Nous concluons donc que ni la voie PI3-Kinase, ni la voie ras-ERK ne sont impliquées dans la modulation de l'expression de la MMP2. Une modulation de l'activité n'est cependant pas exclue.

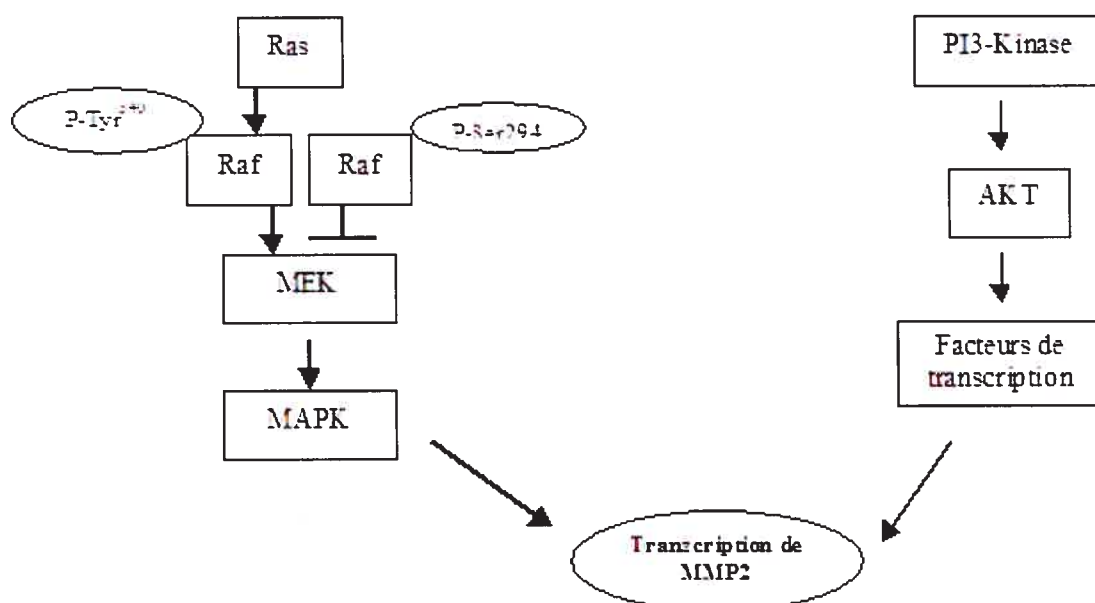


Figure 17 : Implication des voies de signalisation MAPK, PI3-Kinase dans la transcription du gène MMP2 .

IV.2 La MMP9 n'est pas régulée de même manière dans les cellules MDCK et les cellules INV

L'expression de la MMP-9 a été clairement associée à un phénomène métastatique (25). Le gène *mmp9* est localisé sur le chromosome 20. Son promoteur contient des sites de liaison pour les facteurs de transcription AP1, NF- κ B, AP2 et Sp-1. Ceux-ci constituent les éléments essentiels pour la régulation de l'expression de ce gène. Il a été montré par Lakka et al. qu'une mutation dans un de ces sites diminue, d'une façon significative, l'expression de la MMP9 (96).

L'expression de la MMP-9 peut être induite rapidement par des cytokines (80, 83, 93), esters de phorbol (166) et interactions cellule-cellule (12), et être modulée par Akt/PKB (90). Plusieurs molécules et voies de signalisation sont impliquées dans l'induction de la MMP-9 dans les cancers du sein, comme par exemple le EGF (*epidermal growth factor*) et MAPK (93, 135, 136)

Il est reconnu que l'activation des protéines Kinases C (PKC) induit l'expression de MMP9 via l'activation du facteur de transcription NF- κ B (**Figure 18**). Le TPA agit comme un homologue du diacylglycérol, et active ainsi plusieurs isoformes des PKC dont les PKC classiques (α , β_I , β_{II} et γ) et nouvelles (δ , ϵ , η , θ et μ), en induisant leur translocation du cytosol à la membrane. Le TPA est ainsi couramment utilisé pour l'étude des voies de signalisation impliquées dans l'expression des MMPs dans les cellules cancéreuses.

Le niveau d'expression de la MMP9 est identique dans les cellules MDCK, MSV-MDCK et MSV-MDCK-INV (**Figure 11, p68**). Toutefois, contrairement aux cellules parentales MDCK, le traitement des cellules INV avec le TPA n'induit aucun changement de l'expression (**Figure 12, p69**) et/ou de l'activation de la MMP9 dans ces cellules (**Figure 13, p71**). Il est connu que les PKC constituent le récepteur cellulaire majeur des esters de phorbol (126). Il demeure possible que l'identité des PKC exprimées dans les cellules MDCK, HT1080 et INV ainsi que le niveau d'expression de celles-ci ne soit pas le même. En effet comme les PKC atypiques ne répondent pas au DAG, une expression préférentielle de celles-ci dans les cellules INV

pourrait rendre compte de l'absence de modulation de l'expression et de l'activité de la MMP9 dans ces cellules. Enfin, la présence d'une ou de plusieurs mutations dans la voie de signalisation menant à l'expression de la MMP9 via les PKC, est aussi possible. Récemment, des études effectuées dans le laboratoire du Dr Josette Noël, ont montré qu'une incubation prolongée de 24 heures avec le TPA (100 ng/ml) a un effet inhibiteur sur l'expression de la PKC α et sur le degré d'activation de celle-ci (résultats non montrés). Bien que ce type de protocole soit utilisé dans la littérature pour mettre en lumière une augmentation de l'expression et/ou de l'activité de la MMP9, la régulation négative de la PKC α , du moins, dans les cellules INV, pourrait facilement expliquer le fait que le TPA n'ait pas stimulé l'activité de la MMP9 dans ces cellules.

Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Smolian et al (154) qui montrent que, contrairement aux cellules HT1080, la stimulation par le PMA, (phorbol myristate acetate, un analogue du TPA) des cellules HRSF (*human rheumatoid synovial fibroblasts*) n'augmente pas la sécrétion de MMP9.

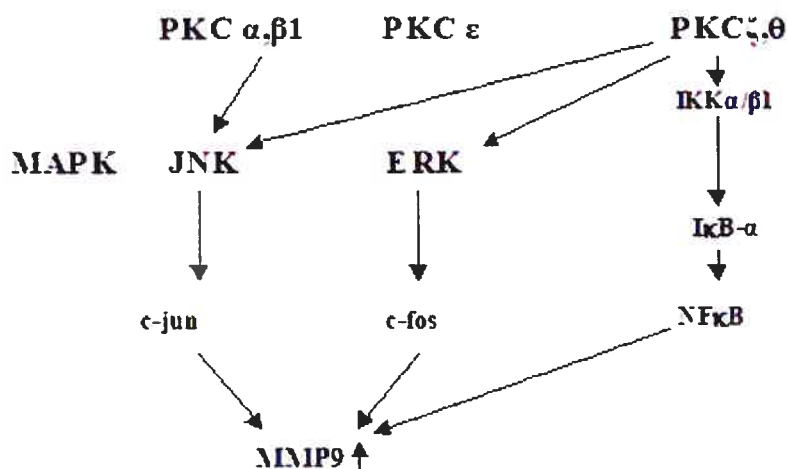


Figure 18 : Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de MMP2 et 9 dans les fibroblastes.

IV.3 Relation entre l'expression de la MMP2 et l'activation de c-Met par son ligand HGF

Il est rapporté par différents auteurs que le HGF augmente l'expression de la MMP2 dans les cellules cancéreuses U-1810 d'origine pulmonaire (33), dans les cellules Caco-2 de carcinome du côlon (89), et les kératinocytes (23). Comme nous étions surpris des résultats que nous avons obtenus relatifs au niveau de MMP2 et du degré d'activation de celle-ci dans les cellules INV, qui rappellons-le, est une modèle de cellules tumorales et invasives, nous avons voulu déterminer si la stimulation par le HGF des cellules MDCK et des cellules transformées pouvait induire ces effets. Nous avons réussi à démontrer un lien direct entre la durée de traitement par le r-HGF et le niveau d'expression de la MMP2 dans les cellules MDCK et MSV-MDCK (**Figure 14 p72**). En effet, une augmentation transitoire de la quantité de MMP2 est observée après 30-180 min de traitement ; le signal étant similaire aux cellules non-traitées après 24 h de traitement. Cette diminution de la quantité de protéines après une stimulation prolongée par le HGF pourrait être due à une régulation négative spécifique de la synthèse de MMP2 via la stimulation de c-Met. Rappelons ici que le niveau de p125^{FAK} demeure constant même après 24 heures de stimulation par le HGF, rejetant d'emblée la possibilité d'une dégradation non-spécifique. Cependant, aucune régulation de ce genre n'a encore été rapportée dans la littérature

La modulation négative de l'expression de la MMP2 via la voie HGF/c-Met expliquerait par ailleurs pourquoi les cellules INV, qui sécrètent d'une façon constitutive le HGF, n'ont pas des niveaux élevés de MMP2. Voulant démontrer que la stimulation continue du récepteur c-Met par le HGF sécrété pourrait expliquer la non-stimulation de la synthèse de MMP2 dans les cellules cancéreuses et invasives, comparativement aux cellules MDCK de type sauvage, nous avons traité les cellules INV avec l'anticorps anti-HGF pendant 24-48 h afin de bloquer complètement l'activation de c-Met (172) (**Figure 14, p72**). Alors que nous attendions une chute du niveau de MMP2, cette manœuvre n'a eu aucun effet sur le niveau d'expression de MMP2 bien qu'elle induit une diminution significative du degré de phosphorylation (activation) de c-Met (témoignant de l'efficacité du traitement à l'anti-HGF). Il

demeure possible, cependant, que le faible degré d'activité de c-Met ait suffi à enclencher la cascade de signalisation menant à la transcription du gène *mmp2* et/ou à la traduction des ARNm codant pour MMP2. Bien que la titration du HGF sécrété par l'utilisation de l'anticorps anti-HGF pendant 24 h ne nous ait pas permis de conclure avec certitude, il demeure possible que l'expression temporelle de la MMP2 soit modulée par le HGF.

Welgus et al ont montré que l'induction de la synthèse de MMPs par le HGF/SF dans les kératinocytes dépend à la fois d'activité *tyrosine kinase* (phosphorylation sur tyrosine) et de l'activation des protéines kinases C (46). En effet le traitement des kératinocytes avec l'herbimycine A (inhibiteur de tyrosine kinase) ou avec la staurosporine (inhibiteur de la protéine kinase C) inhibe l'induction de MMPs par le HGF. Cependant le traitement des kératinocytes avec l'orthovanadate (inhibiteur des phosphatases à résidus tyrosine) potentialise l'effet inducteur du HGF/SF sur la production des MMPs.

IV.4 La MMP9 est active dans les cellules MDCK uniquement

Bien que le niveau d'expression de la MMP9 soit équivalent dans les cellules MDCK, MSV-MDCK et INV, la MMP9 est plus active dans les cellules MDCK. Aucune activité n'est détectée dans les cellules INV (**Figure 13,p71**). Ce résultat nous a beaucoup surpris. Selon nous, deux hypothèses peuvent expliquer ces observations.

1- *La MMP9 ne serait pas sécrétée dans ces cellules.* Pour vérifier cette possibilité, nous avons tenté de la détecter par immunobuvardage de type Western dans le milieu cellulaire. Malheureusement, aucune conclusion n'a pu être tirée. En fait, on ne voit aucune bande correspondante à la MMP9 dans le milieu cellulaire, même dans les cellules MDCK où elle y est très active (résultats non-présentés). Selon les résultats présentés dans la littérature i.e le ratio « activité/MMP9 exprimée », on aurait dû être capable de la détecter pour nos cellules MDCK, également. D'autre part, il est reconnu que, dans les chondrocytes, la MT-MMP1 active la pro-MMP13, qui à son tour participe à l'activation de la pro-MMP9 (45). On peut donc supposer que 2- il y a plus de MT-MMP1 dans les cellules MDCK et alors, plus de MMP9 active

IV.5 Activité de la MMP2

Pour une raison que nous ignorons, l'activité de la MMP2 n'est détectée dans aucun des modèles cellulaires canines étudiées. Seules les cellules HT-1080 présentent une activité nettement mesurable dans les conditions expérimentales choisies. Le niveau d'expression de la MMP2 dans les cellules MDCK, MSV-MDCK et INV peut être trop faible pour être détectée en zymmographie. Pour contourner ce problème, nous avons tenté de concentrer les milieux cellulaires en utilisant des filtres *centricon* mais aucune activité n'a été détectée. Nous avons également ensemencé nos cellules à des densités trop élevées afin d'augmenter nos chances de détecter la MMP2 dans le milieu cellulaire mais aucune activité n'a pu être mesurée dans ces trois lignées cellulaires.

IV.6 MMP et motilité cellulaire

Les métalloprotéases, comme nous l'avons déjà mentionné dans la partie introduction de ce mémoire, constituent une famille de 25 membres. Nous avons choisi d'étudier les gélatinases MMP2 et 9 en se basant sur le fait que ces métalloprotéases sont très souvent reliées au caractère invasif dans les lignées cellulaires U251 (71, 94) et Caco2 (71, 94), et qu'une relation étroite est établie entre MMP2, le HGF et c-Met (23, 89, 177). Toutefois, d'autres MMPs, soit les MMP7 (182), MMP26 (133), MMP1, MMP3, MMP11, MMP12, MMP13 (42) et MT1-MMP sont aussi reliées aux caractères tumoral dans quelques lignées cellulaires (Tableau III). Une ou plusieurs de ces MMPs pourraient contribuer à une partie du phénotype motile des cellules INV. En effet, nous avons montré que l'ilomastat ralentit légèrement le mouvement des cellules INV, lequel avait été stimulé par la destruction de la couche de cellules (**Figure 16, p78**). Ce ralentissement du mouvement cellulaire est sûrement dû à l'inhibition d'une ou de plusieurs métalloprotéases exprimées et secrétées par ces cellules. On peut donc envisager qu'elles soient impliquées dans leur motilité. L'identité de ces métalloprotéases n'a pas pu être étudiée dans le cadre de ce travail, soit du fait de notre incapacité à les identifier, soit par manque de temps.

Rappelons enfin que les voies PI3-kinase-Akt, ras-ERK, PLC γ 1-PKC et p38^{MAPK} contribuent toutes, à des degrés différents, à moduler les mécanismes impliqués dans le phénomène de motilité des cellules INV i.e la réorganisation du cytosquelette et la

protrusion des pseudopodes. En effet, l'addition d'inhibiteurs spécifiques de chacune de ces voies de signalisation mène à une inhibition partielle, et additive, du mouvement cellulaire (résultats du laboratoire en préparation pour publication). Jia et collaborateurs ont récemment caractérisé, dans ces cellules INV, un autre processus pouvant aussi contribuer au phénomène de motilité : le bourgeonnement membranaire (*membrane blebbing*) (184). Il est ainsi montré que la voie d'activation de RhoK (*rho kinase*) menant à l'activation de la $p38^{\text{MAPK}}$ module une fraction importante du phénomène de motilité, et stimule à la fois le « *membrane blebbing* ». Il est proposé que ce mouvement membranaire soit précurseur aux prolongements de type pseudopodial, et donc, précurseur au mouvement cellulaire. Il se pourrait très bien que la transformation par le virus MSV ait provoqué l'activation et le développement de plusieurs systèmes parallèles impliqués dans la motilité. Il est logique de croire que l'activation de différentes voies de signalisation et l'activation de certaines métalloprotéases auraient favorisé la sélection des cellules INV à partir de la population de cellules transformées par le virus, les cellules MSV-MDCK.

Chapitre 5

Perspectives

V. PERSPECTIVES

Dans cette étude nous avons démontré que les cellules MSV-MDCK-INV au caractère tumoral et invasif ne sécrètent pas les MMP2 ni les MMP9 et que ces dernières ne sont pas impliquées dans la motilité de ces cellules. L'effet de l'ilomastat sur leur capacité à réparer une plaie suggère toutefois que certaines MMPs participent à cette migration cellulaire. En effet, comme les MMPs constituent une grande famille de 25 membres, d'autres MMPs, en particulier les MMP3,7 et 13, pourraient y jouer un rôle dans la motilité cellulaire.

L'utilisation d'anticorps dirigés contre les MMPs de cellules canines s'est avérée techniquement très difficile, certainement dû au fait que les séquences peptidiques des MMPs canines diffèrent significativement ou même légèrement des séquences humaines. Comme il est plus facile de modifier les conditions d'hybridation de sondes nucléotidiques que d'anticorps (conditions de stringence, longueur et position de la sonde), on pourrait tenter de détecter les MMPs d'intérêt par immunobuvardage de type *Northern*. Des comparaisons de séquences nucléotidiques entre les MMPs d'espèces connues permettront de préciser les régions les plus homologues. Des sondes basées sur ces séquences seront ensuite dessinées. Après avoir identifié ces MMPs, l'activité protéolytique de ces MMPs sera évaluée au moyen de troupes commerciales. La technique des siRNA « *small interference RNA* » pourrait aussi être utilisée afin d'inhiber la transcription et donc la synthèse de telle ou telle MMP, puis regarder par la technique de la plaie et/ou chambre de Boyden, l'effet de cette inhibition sur la motilité cellulaire. L'utilisation de logiciels permet en effet d'identifier la position et la séquence les plus propices à une hybridation et annihilation efficaces des siRNAs.

Si l'une des MMPs investiguées s'avèrent avoir un rôle dans la motilité et l'invasion de cellules INV, cette lignée cellulaire pourrait être utilisée pour tester l'effet de certains inhibiteurs pharmacologiques à large spectre ou d'action plus pointue des MMPs sur la motilité et l'invasion tumorale.

Chapitre 6

Références

VI. RÉFÉRENCES

1. **Aglund K, Rauvala M, Puistola U, Angstrom T, Turpeenniemi-Hujanen T, Zackrisson B, and Stendahl U.** Gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in endometrial cancer-MMP-9 correlates to the grade and the stage. *Gynecol Oncol* 94: 699-704, 2004.
2. **Agren MS, Mirastschijski U, Karlsmark T, and Saarialho-Kere UK.** Topical synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases delays epidermal regeneration of human wounds. *Exp Dermatol* 10: 337-348, 2001.
3. **Aimes RT and Quigley JP.** Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem* 270: 5872-5876, 1995.
4. **Annabi B, Lachambre M, Bousquet-Gagnon N, Page M, Gingras D, and Beliveau R.** Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains. *Biochem J* 353: 547-553, 2001.
5. **Annabi B, Lachambre MP, Bousquet-Gagnon N, Page M, Gingras D, and Beliveau R.** Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1542: 209-220, 2002.
6. **Annabi B, Lee YT, Martel C, Pilorget A, Bahary JP, and Beliveau R.** Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Biol Ther* 2: 642-649, 2003.
7. **Annabi B, Lee YT, Turcotte S, Naud E, Desrosiers RR, Champagne M, Eliopoulos N, Galipeau J, and Beliveau R.** Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells* 21: 337-347, 2003.
8. **Annabi B, Pilorget A, Bousquet-Gagnon N, Gingras D, and Beliveau R.** Calmodulin inhibitors trigger the proteolytic processing of membrane type-1 matrix

metalloproteinase, but not its shedding in glioblastoma cells. *Biochem J* 359: 325-333, 2001.

9. **Annabi B, Shedid D, Ghosn P, Kenigsberg RL, Desrosiers RR, Bojanowski MW, Beaulieu E, Nassif E, Moumdjian R, and Beliveau R.** Differential regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 35: 539-546, 2002.

10. **Annabi B, Thibeault S, Lee YT, Bousquet-Gagnon N, Eliopoulos N, Barrette S, Galipeau J, and Beliveau R.** Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells. *Exp Hematol* 31: 640-649, 2003.

11. **Annabi B, Thibeault S, Moumdjian R, and Beliveau R.** Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells. *J Biol Chem* 279: 21888-21896, 2004.

12. **Aoudjit F, Potworowski EF, and St-Pierre Y.** Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1. *J Immunol* 160: 2967-2973, 1998.

13. **Arguello-Ramirez J, Perez-Cardenas E, Delgado-Chavez R, Solorza-Luna G, Villa-Trevino S, and Arenas-Huertero F.** Matrix metalloproteinases-2, -3, and -9 secreted by explants of benign and malignant lesions of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer* 14: 333-340, 2004.

14. **Auersperg N, Maines-Bandiera SL, and Dyck HG.** Ovarian carcinogenesis and the biology of ovarian surface epithelium. *J Cell Physiol* 173: 261-265, 1997.

15. **Balkovetz DF and Lipschutz JH.** Hepatocyte growth factor and the kidney: it is not just for the liver. *Int Rev Cytol* 186: 225-260, 1999.

16. **Baragi VM, Fliszar CJ, Conroy MC, Ye QZ, Shipley JM, and Welgus HG.** Contribution of the C-terminal domain of metalloproteinases to binding by tissue inhibitor of metalloproteinases. C-terminal truncated stromelysin and matrilysin exhibit equally compromised binding affinities as compared to full-length stromelysin. *J Biol Chem* 269: 12692-12697, 1994.

17. **Bardelli A, Pugliese L, and Comoglio PM.** "Invasive-growth" signaling by the Met/HGF receptor: the hereditary renal carcinoma connection. *Biochim Biophys Acta* 1333: M41-51, 1997.
18. **Bar-Shavit Z, Teitelbaum SL, Stricklin GP, Eisen AZ, Kahn AJ, and Welgus HG.** Differentiation of a human leukemia cell line and expression of collagenase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 5380-5384, 1985.
19. **Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, and Liotta LA.** Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest* 49: 140-147, 1983.
20. **Basset P, Okada A, Chenard MP, Kannan R, Stoll I, Anglard P, Bellocq JP, and Rio MC.** Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol* 15: 535-541, 1997.
21. **Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, and Neurath MF.** TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 21: 491-501, 2004.
22. **Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, and Birchmeier W.** Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 108: 2435-2447, 1989.
23. **Bennett JH, Morgan MJ, Whawell SA, Atkin P, Roblin P, Furness J, and Speight PM.** Metalloproteinase expression in normal and malignant oral keratinocytes: stimulation of MMP-2 and -9 by scatter factor. *Eur J Oral Sci* 108: 281-291, 2000.
24. **Bergers G, Javaherian K, Lo KM, Folkman J, and Hanahan D.** Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* 284: 808-812, 1999.
25. **Bernhard EJ, Gruber SB, and Muschel RJ.** Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4293-4297, 1994.

26. **Bian J and Sun Y.** p53CP, a putative p53 competing protein that specifically binds to the consensus p53 DNA binding sites: a third member of the p53 family? *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14753-14758, 1997.
27. **Billottet C, Elkhatib N, Thiery JP, and Jouanneau J.** Targets of fibroblast growth factor 1 (FGF-1) and FGF-2 signaling involved in the invasive and tumorigenic behavior of carcinoma cells. *Mol Biol Cell* 15: 4725-4734, 2004.
28. **Birchmeier C and Gherardi E.** Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* 8: 404-410, 1998.
29. **Bittmann I, Hentrich M, Bise K, Kolb HJ, and Lohrs U.** Endothelial cells but not epithelial cells or cardiomyocytes are partially replaced by donor cells after allogeneic bone marrow and stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res* 12: 359-366, 2003.
30. **Black P, Carroll R, and Glowacka D.** Expression of platelet-derived growth factor transcripts in medulloblastomas and ependymomas. *Pediatr Neurosurg* 24: 74-78, 1996.
31. **Blood CH and Zetter BR.** Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1032: 89-118, 1990.
32. **Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, and Aaronson SA.** Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251: 802-804, 1991.
33. **Bredin CG, Liu Z, and Klominek J.** Growth factor-enhanced expression and activity of matrix metalloproteases in human non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Res* 23: 4877-4884, 2003.
34. **Calaf GM and Hei TK.** Ionizing radiation induces alterations in cellular proliferation and c-myc, c-jun and c-fos protein expression in breast epithelial cells. *Int J Oncol* 25: 1859-1866, 2004.
35. **Carter BS, Ewing CM, Ward WS, Treiger BF, Aalders TW, Schalken JA, Epstein JI, and Isaacs WB.** Allelic loss of chromosomes 16q and 10q in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 8751-8755, 1990.
36. **Chantrain C.** Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétique dans la progression tumorale. *Médecine science* 18: 565-575, 2002.

37. **Cho NH, Hong KP, Hong SH, Kang S, Chung KY, and Cho SH.** MMP expression profiling in recurred stage IB lung cancer. *Oncogene* 23: 845-851, 2004.
38. **Corcoran ML, Hewitt RE, Kleiner DE, Jr., and Stetler-Stevenson WG.** MMP-2: expression, activation and inhibition. *Enzyme Protein* 49: 7-19, 1996.
39. **Cornil I, Theodorescu D, Kerbel RS, and Poupon MF.** Metastatic dissemination of cancer cells. *Pathol Biol (Paris)* 39: 300-307, 1991.
40. **Cossins J, Dudgeon TJ, Catlin G, Gearing AJ, and Clements JM.** Identification of MMP-18, a putative novel human matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 494-498, 1996.
41. **Crowe DL and Shuler CF.** Regulation of tumor cell invasion by extracellular matrix. *Histol Histopathol* 14: 665-671, 1999.
42. **Denys H, De Wever O, Nusgens B, Kong Y, Sciote R, Le AT, Van Dam K, Jadidizadeh A, Tejpar S, Mareel M, Alman B, and Cassiman JJ.** Invasion and MMP expression profile in desmoid tumours. *Br J Cancer* 90: 1443-1449, 2004.
43. **Di Renzo MF, Narsimhan RP, Olivero M, Bretti S, Giordano S, Medico E, Gaglia P, Zara P, and Comoglio PM.** Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. *Oncogene* 6: 1997-2003, 1991.
44. **d'Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, Smith B, Timpl R, Zardi L, and Murphy G.** Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem* 250: 751-757, 1997.
45. **Dreier R, Grassel S, Fuchs S, Schaumburger J, and Bruckner P.** Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade. *Exp Cell Res* 297: 303-312, 2004.
46. **Dunsmore SE, Rubin JS, Kovacs SO, Chedid M, Parks WC, and Welgus HG.** Mechanisms of hepatocyte growth factor stimulation of keratinocyte metalloproteinase production. *J Biol Chem* 271: 24576-24582, 1996.
47. **Edwards DR, Leco KJ, Beaudry PP, Atadja PW, Veillette C, and Riabowol KT.** Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in young and old human fibroblasts. *Exp Gerontol* 31: 207-223, 1996.

48. **Emonard HP, Remacle AG, Noel AC, Grimaud JA, Stetler-Stevenson WG, and Foidart JM.** Tumor cell surface-associated binding site for the M(r) 72,000 type IV collagenase. *Cancer Res* 52: 5845-5848, 1992.
49. **Fafournoux P, Noel J, and Pouyssegur J.** Evidence that Na⁺/H⁺ exchanger isoforms NHE1 and NHE3 exist as stable dimers in membranes with a high degree of specificity for homodimers. *J Biol Chem* 269: 2589-2596, 1994.
50. **Fidler IJ.** Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 50: 6130-6138, 1990.
51. **Fidler IJ.** Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 38: 2651-2660, 1978.
52. **Folkman J, Watson K, Ingber D, and Hanahan D.** Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339: 58-61, 1989.
53. **Forget MA, Desrosiers RR, and Beliveau R.** Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. *Can J Physiol Pharmacol* 77: 465-480, 1999.
54. **Fosang AJ, Neame PJ, Last K, Hardingham TE, Murphy G, and Hamilton JA.** The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases, and cathepsin B. *J Biol Chem* 267: 19470-19474, 1992.
55. **Fridman R, Toth M, Pena D, and Mobashery S.** Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res* 55: 2548-2555, 1995.
56. **Furge KA, Zhang YW, and Vande Woude GF.** Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 19: 5582-5589, 2000.
57. **Gaiotto MA, Focchi J, Ribalta JL, Stavale JN, Baracat EC, Lima GR, and Guerreiro da Silva ID.** Comparative study of MMP-2 (matrix metalloproteinase 2) immune expression in normal uterine cervix, intraepithelial neoplasias, and squamous cells cervical carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 190: 1278-1282, 2004.
58. **Galis ZS, Kranzhofer R, Fenton JW, 2nd, and Libby P.** Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 483-489, 1997.

59. **Gherardi E, Gray J, Stoker M, Perryman M, and Furlong R.** Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein that modulates epithelial interactions and movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5844-5848, 1989.
60. **Gherardi E, Sharpe M, Lane K, Sirulnik A, and Stoker M.** Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF), the c-met receptor and the behaviour of epithelial cells. *Symp Soc Exp Biol* 47: 163-181, 1993.
61. **Gingras D, Bousquet-Gagnon N, Langlois S, Lachambre MP, Annabi B, and Beliveau R.** Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Lett* 507: 231-236, 2001.
62. **Gingras D, Page M, Annabi B, and Beliveau R.** Rapid activation of matrix metalloproteinase-2 by glioma cells occurs through a posttranslational MT1-MMP-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1497: 341-350, 2000.
63. **Gingrich JR, Barrios RJ, Morton RA, Boyce BF, DeMayo FJ, Finegold MJ, Angelopoulou R, Rosen JM, and Greenberg NM.** Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer Res* 56: 4096-4102, 1996.
64. **Giordano S, Ponzetto C, Di Renzo MF, Cooper CS, and Comoglio PM.** Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein. *Nature* 339: 155-156, 1989.
65. **Gohji K, Nakajima M, Fabra A, Bucana CD, von Eschenbach AC, Tsuruo T, and Fidler IJ.** Regulation of gelatinase production in metastatic renal cell carcinoma by organ-specific fibroblasts. *Jpn J Cancer Res* 85: 152-160, 1994.
66. **Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, and Thorgeirsson UP.** Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74: 111-122, 1997.
67. **Grinnell F, Zhu M, and Parks WC.** Collagenase-1 complexes with alpha2-macroglobulin in the acute and chronic wound environments. *J Invest Dermatol* 110: 771-776, 1998.
68. **Grobelny D, Poncz L, and Galardy RE.** Inhibition of human skin fibroblast collagenase, thermolysin, and *Pseudomonas aeruginosa* elastase by peptide hydroxamic acids. *Biochemistry* 31: 7152-7154, 1992.

69. **Gual P, Giordano S, Anguissola S, and Comoglio PM.** Differential requirement of the last C-terminal tail of Met receptor for cell transformation and invasiveness. *Oncogene* 20: 5493-5502, 2001.
70. **Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, and Herrlich P.** A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65: 13-24, 1991.
71. **Halvorsen B, Staff AC, Ligaarden S, Prydz K, and Kolset SO.** Lithocholic acid and sulphated lithocholic acid differ in the ability to promote matrix metalloproteinase secretion in the human colon cancer cell line CaCo-2. *Biochem J* 349: 189-193, 2000.
72. **Hamasuna R, Kataoka H, Moriyama T, Itoh H, Seiki M, and Koono M.** Regulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) by hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) in human glioma cells: HGF/SF enhances MMP-2 expression and activation accompanying up-regulation of membrane type-1 MMP. *Int J Cancer* 82: 274-281, 1999.
73. **Hanahan D and Folkman J.** Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364, 1996.
74. **Hao JL, Nagano T, Nakamura M, Kumagai N, Mishima H, and Nishida T.** Effect of galardin on collagen degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Exp Eye Res* 69: 595-601, 1999.
75. **Hart IR and Saini A.** Biology of tumour metastasis. *Lancet* 339: 1453-1457, 1992.
76. **Hayashi Y, Iwato M, Hasegawa M, Tachibana O, von Deimling A, and Yamashita J.** Malignant transformation of a gangliocytoma/ganglioglioma into a glioblastoma multiforme: a molecular genetic analysis. Case report. *J Neurosurg* 95: 138-142, 2001.
77. **Henriet P, Blavier L, and Declerck YA.** Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *Apmis* 107: 111-119, 1999.
78. **Hess KR and Abbruzzese JL.** Matrix metalloproteinase inhibition of pancreatic cancer: matching mechanism of action to clinical trial design. *J Clin Oncol* 19: 3445-3446, 2001.

79. **Hidalgo M and Eckhardt SG.** Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 93: 178-193, 2001.
80. **Huang HY, Wen Y, Irwin JC, Kruessel JS, Soong YK, and Polan ML.** Cytokine-mediated regulation of 92-kilodalton type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 messenger ribonucleic acid expression in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1721-1729, 1998.
81. **Humphrey PA, Zhu X, Zarnegar R, Swanson PE, Ratliff TL, Vollmer RT, and Day ML.** Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma. *Am J Pathol* 147: 386-396, 1995.
82. **Inoue M, Kratz G, Haegerstrand A, and Stahle-Backdahl M.** Collagenase expression is rapidly induced in wound-edge keratinocytes after acute injury in human skin, persists during healing, and stops at re-epithelialization. *J Invest Dermatol* 104: 479-483, 1995.
83. **Ismair MG, Ries C, Lottspeich F, Zang C, Kolb HJ, and Petrides PE.** Autocrine regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression and secretion by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in NB4 leukemic cells: specific involvement of TNF receptor type 1. *Leukemia* 12: 1136-1143, 1998.
84. **Iyer A, Kmiecik TE, Park M, Daar I, Blair D, Dunn KJ, Suttrave P, Ihle JN, Bodescot M, and Vande Woude GF.** Structure, tissue-specific expression, and transforming activity of the mouse met protooncogene. *Cell Growth Differ* 1: 87-95, 1990.
85. **Kahari VM and Saarialho-Kere U.** Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 6: 199-213, 1997.
86. **Karagiannis ED and Popel AS.** A theoretical model of type I collagen proteolysis by matrix metalloproteinase (MMP) 2 and membrane type 1 MMP in the presence of tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *J Biol Chem* 279: 39105-39114, 2004.
87. **Kataoka H, Hamasuna R, Itoh H, Kitamura N, and Koono M.** Activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 60: 6148-6159, 2000.
88. **Kawashima A, Nakanishi I, Tsuchiya H, Roessner A, Obata K, and Okada Y.** Expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase)

induced by tumour necrosis factor alpha correlates with metastatic ability in a human osteosarcoma cell line. *Virchows Arch* 424: 547-552, 1994.

89. **Kermorgant S, Aparicio T, Dessirier V, Lewin MJ, and Lehy T.** Hepatocyte growth factor induces colonic cancer cell invasiveness via enhanced motility and protease overproduction. Evidence for PI3 kinase and PKC involvement. *Carcinogenesis* 22: 1035-1042, 2001.
90. **Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS, and Chung J.** Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *Faseb J* 15: 1953-1962, 2001.
91. **Kinoshita T, Sato H, Okada A, Ohuchi E, Imai K, Okada Y, and Seiki M.** TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads. *J Biol Chem* 273: 16098-16103, 1998.
92. **Koklitis PA, Murphy G, Sutton C, and Angal S.** Purification of recombinant human prostromelysin. Studies on heat activation to give high-Mr and low-Mr active forms, and a comparison of recombinant with natural stromelysin activities. *Biochem J* 276 (Pt 1): 217-221, 1991.
93. **Kondapaka SB, Fridman R, and Reddy KB.** Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 70: 722-726, 1997.
94. **Koul D, Parthasarathy R, Shen R, Davies MA, Jasser SA, Chintala SK, Rao JS, Sun Y, Benveniste EN, Liu TJ, and Yung WK.** Suppression of matrix metalloproteinase-2 gene expression and invasion in human glioma cells by MMAC/PTEN. *Oncogene* 20: 6669-6678, 2001.
95. **Kugler A, Hemmerlein B, Thelen P, Kallerhoff M, Radzun HJ, and Ringert RH.** Expression of metalloproteinase 2 and 9 and their inhibitors in renal cell carcinoma. *J Urol* 160: 1914-1918, 1998.
96. **Lakka SS, Jasti SL, Kyritsis AP, Yung WK, Ali-Osman F, Nicolson GL, and Rao JS.** Regulation of MMP-9 (type IV collagenase) production and invasiveness in gliomas by the extracellular signal-regulated kinase and jun amino-terminal kinase signaling cascades. *Clin Exp Metastasis* 18: 245-252, 2000.

97. **Laplane A, Liu D, Demeule M, Annabi B, Murphy GF, Daloze P, Chen H, and Beliveau R.** Modulation of matrix gelatinases and metalloproteinase-activating process in acute kidney rejection. *Transpl Int* 16: 262-269, 2003.
98. **Le PU, Nguyen TN, Drolet-Savoie P, Leclerc N, and Nabi IR.** Increased beta-actin expression in an invasive moloney sarcoma virus-transformed MDCK cell variant concentrates to the tips of multiple pseudopodia. *Cancer Res* 58: 1631-1635, 1998.
99. **Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP, and Edwards DR.** Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem* 269: 9352-9360, 1994.
100. **Lehti KI.** *Membrane-type-1 matrix metalloproteinase in pericellular proteolysis and cell migration.* Finland: Helsinki, 2002.
101. **Lein M, Jung K, Laube C, Hubner T, Winkelmann B, Stephan C, Hauptmann S, Rudolph B, Schnorr D, and Loening SA.** Matrix-metalloproteinases and their inhibitors in plasma and tumor tissue of patients with renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 85: 801-804, 2000.
102. **Li H, Shimura H, Aoki Y, Date K, Matsumoto K, Nakamura T, and Tanaka M.** Hepatocyte growth factor stimulates the invasion of gallbladder carcinoma cell lines in vitro. *Clin Exp Metastasis* 16: 74-82, 1998.
103. **Li HC, Cao DC, Liu Y, Hou YF, Wu J, Lu JS, Di GH, Liu G, Li FM, Ou ZL, Jie C, Shen ZZ, and Shao ZM.** Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 88: 75-85, 2004.
104. **Liotta LA, Mandler R, Murano G, Katz DA, Gordon RK, Chiang PK, and Schiffmann E.** Tumor cell autocrine motility factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 3302-3306, 1986.
105. **Liotta LA, Steeg PS, and Stetler-Stevenson WG.** Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64: 327-336, 1991.
106. **Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, and Bissell MJ.** Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that

- leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 139: 1861-1872, 1997.
107. **Lockshin RA and Zakeri Z.** Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 545-550, 2001.
 108. **Losi L, Luppi G, and Benhattar J.** Assessment of K-ras, Smad4 and p53 gene alterations in colorectal metastases and their role in the metastatic process. *Oncol Rep* 12: 1221-1225, 2004.
 109. **Madlener M, Mauch C, Conca W, Brauchle M, Parks WC, and Werner S.** Regulation of the expression of stromelysin-2 by growth factors in keratinocytes: implications for normal and impaired wound healing. *Biochem J* 320 (Pt 2): 659-664, 1996.
 110. **Madlener M, Parks WC, and Werner S.** Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. *Exp Cell Res* 242: 201-210, 1998.
 111. **Maggiora P, Gambarotta G, Olivero M, Giordano S, Di Renzo MF, and Comoglio PM.** Control of invasive growth by the HGF receptor family. *J Cell Physiol* 173: 183-186, 1997.
 112. **Martin DC, Fowlkes JL, Babic B, and Khokha R.** Insulin-like growth factor II signaling in neoplastic proliferation is blocked by transgenic expression of the metalloproteinase inhibitor TIMP-1. *J Cell Biol* 146: 881-892, 1999.
 113. **Matsumoto S, Katoh M, Saito S, Watanabe T, and Masuho Y.** Identification of soluble type of membrane-type matrix metalloproteinase-3 formed by alternatively spliced mRNA. *Biochim Biophys Acta* 1354: 159-170, 1997.
 114. **Matsumura S, Oue N, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Yamaguchi Y, Imai K, Nakachi K, Matsusaki K, Chayama K, and Yasui W.** A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 131: 19-25, 2005.
 115. **Matsumura Y and Tarin D.** Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 340: 1053-1058, 1992.
 116. **Mauviel A.** Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem* 53: 288-295, 1993.

117. **Mignatti P and Rifkin DB.** Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein* 49: 117-137, 1996.
118. **Miyasaka M.** Cancer metastasis and adhesion molecules. *Clin Orthop*: 10-18, 1995.
119. **Monvoisin A, Bisson C, Si-Tayeb K, Balabaud C, Desmouliere A, and Rosenbaum J.** Involvement of matrix metalloproteinase type-3 in hepatocyte growth factor-induced invasion of human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 97: 157-162, 2002.
120. **Murphy G, Nguyen Q, Cockett MI, Atkinson SJ, Allan JA, Knight CG, Willenbrock F, and Docherty AJ.** Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J Biol Chem* 269: 6632-6636, 1994.
121. **Nakahara H, Howard L, Thompson EW, Sato H, Seiki M, Yeh Y, and Chen WT.** Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7959-7964, 1997.
122. **Nakamura H, Fujii Y, Ohuchi E, Yamamoto E, and Okada Y.** Activation of the precursor of human stromelysin 2 and its interactions with other matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem* 253: 67-75, 1998.
123. **Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, and Shimizu S.** Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342: 440-443, 1989.
124. **Naldini L, Vigna E, Bardelli A, Follenzi A, Galimi F, and Comoglio PM.** Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *J Biol Chem* 270: 603-611, 1995.
125. **Nicolson GL and Custead SE.** Effects of chemotherapeutic drugs on platelet and metastatic tumor cell-endothelial cell interactions as a model for assessing vascular endothelial integrity. *Cancer Res* 45: 331-336, 1985.
126. **Nishizuka Y.** Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* 225: 1365-1370, 1984.
127. **Nyssen-Behet.** Les métastases osseuses ou le parcours du combattant. *Louvain Med* 118: 342-358, 1999.

128. **Oh RR, Park JY, Lee JH, Shin MS, Kim HS, Lee SK, Kim YS, Lee SH, Lee SN, Yang YM, Yoo NJ, Lee JY, and Park WS.** Expression of HGF/SF and Met protein is associated with genetic alterations of VHL gene in primary renal cell carcinomas. *Apmis* 110: 229-238, 2002.
129. **Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, and Okada Y.** Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 272: 2446-2451, 1997.
130. **Okada A, Tomasetto C, Lutz Y, Bellocq JP, Rio MC, and Basset P.** Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing: evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A. *J Cell Biol* 137: 67-77, 1997.
131. **Okada Y and Nakanishi I.** Activation of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and matrix metalloproteinase 2 ('gelatinase') by human neutrophil elastase and cathepsin G. *FEBS Lett* 249: 353-356, 1989.
132. **Pendas AM, Knauper V, Puente XS, Llano E, Mattei MG, Apte S, Murphy G, and Lopez-Otin C.** Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. *J Biol Chem* 272: 4281-4286, 1997.
133. **Pilka R, Norata GD, Domanski H, Andersson C, Hansson S, Eriksson P, and Casslen B.** Matrix metalloproteinase-26 (matrilysin-2) expression is high in endometrial hyperplasia and decreases with loss of histological differentiation in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 94: 661-670, 2004.
134. **Ray JM and Stetler-Stevenson WG.** The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 7: 2062-2072, 1994.
135. **Razandi M, Pedram A, Park ST, and Levin ER.** Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem* 278: 2701-2712, 2003.
136. **Reddy KB, Krueger JS, Kondapaka SB, and Diglio CA.** Mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulates the expression of progelatinase B (MMP-9) in breast epithelial cells. *Int J Cancer* 82: 268-273, 1999.

137. **Rice A and Banda MJ.** Neutrophil elastase processing of gelatinase A is mediated by extracellular matrix. *Biochemistry* 34: 9249-9256, 1995.
138. **Ries C, Kolb H, and Petrides PE.** Regulation of 92-kD gelatinase release in HL-60 leukemia cells: tumor necrosis factor-alpha as an autocrine stimulus for basal- and phorbol ester-induced secretion. *Blood* 83: 3638-3646, 1994.
139. **Rosen EM, Knesel J, and Goldberg ID.** Scatter factor and its relationship to hepatocyte growth factor and met. *Cell Growth Differ* 2: 603-607, 1991.
140. **Rosen EM, Nigam SK, and Goldberg ID.** Scatter factor and the c-met receptor: a paradigm for mesenchymal/epithelial interaction. *J Cell Biol* 127: 1783-1787, 1994.
141. **Saarialho-Kere UK, Chang ES, Welgus HG, and Parks WC.** Distinct localization of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases expression in wound healing associated with ulcerative pyogenic granuloma. *J Clin Invest* 90: 1952-1957, 1992.
142. **Saarialho-Kere UK, Pentland AP, Birkedal-Hansen H, Parks WC, and Welgus HG.** Distinct populations of basal keratinocytes express stromelysin-1 and stromelysin-2 in chronic wounds. *J Clin Invest* 94: 79-88, 1994.
143. **Sager R.** Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science* 246: 1406-1412, 1989.
144. **Sato H, Kinoshita T, Takino T, Nakayama K, and Seiki M.** Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett* 393: 101-104, 1996.
145. **Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, and Seiki M.** A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370: 61-65, 1994.
146. **Sato T, del Carmen Ovejero M, Hou P, Heegaard AM, Kumegawa M, Foged NT, and Delaisse JM.** Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. *J Cell Sci* 110 (Pt 5): 589-596, 1997.
147. **Scarpino S, Stoppacciaro A, Colarossi C, Cancellario F, Marzullo A, Marchesi M, Biffoni M, Comoglio PM, Prat M, and Ruco LP.** Hepatocyte growth

factor (HGF) stimulates tumour invasiveness in papillary carcinoma of the thyroid. *J Pathol* 189: 570-575, 1999.

148. **Schmalfeldt B, Prechtel D, Harting K, Spathe K, Rutke S, Konik E, Fridman R, Berger U, Schmitt M, Kuhn W, and Lengyel E.** Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 7: 2396-2404, 2001.

149. **Schmidt L, Junker K, Weirich G, Glenn G, Choyke P, Lubensky I, Zhuang Z, Jeffers M, Vande Woude G, Neumann H, Walther M, Linehan WM, and Zbar B.** Two North American families with hereditary papillary renal carcinoma and identical novel mutations in the MET proto-oncogene. *Cancer Res* 58: 1719-1722, 1998.

150. **Schwartz JD, Shamamian P, Monea S, Whiting D, Marcus SG, Galloway AC, and Mignatti P.** Activation of tumor cell matrix metalloproteinase-2 by neutrophil proteinases requires expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Surgery* 124: 232-238, 1998.

151. **Seftor RE, Seftor EA, Stetler-Stevenson WG, and Hendrix MJ.** The 72 kDa type IV collagenase is modulated via differential expression of alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins during human melanoma cell invasion. *Cancer Res* 53: 3411-3415, 1993.

152. **Silberman S, Janulis M, and Schultz RM.** Characterization of downstream Ras signals that induce alternative protease-dependent invasive phenotypes. *J Biol Chem* 272: 5927-5935, 1997.

153. **Simard D and Nabi IR.** Inverse relation of autocrine motility factor receptor and E-cadherin expression following MDCK epithelial cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun* 219: 122-127, 1996.

154. **Smolian H, Aurer A, Sittinger M, Zacher J, Bernimoulin JP, Burmester GR, and Kolkenbrock H.** Secretion of gelatinases and activation of gelatinase A (MMP-2) by human rheumatoid synovial fibroblasts. *Biol Chem* 382: 1491-1499, 2001.

155. **Sounni NE, Janssen M, Foidart JM, and Noel A.** Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol* 22: 55-61, 2003.

156. **Stanton H, Gavrilovic J, Atkinson SJ, d'Ortho MP, Yamada KM, Zardi L, and Murphy G.** The activation of ProMMP-2 (gelatinase A) by HT1080 fibrosarcoma

cells is promoted by culture on a fibronectin substrate and is concomitant with an increase in processing of MT1-MMP (MMP-14) to a 45 kDa form. *J Cell Sci* 111 (Pt 18): 2789-2798, 1998.

157. **Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, and Sobel ME.** Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 80: 200-204, 1988.

158. **Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, and Goldberg GI.** Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270: 5331-5338, 1995.

159. **Swellam M, Ismail M, Eissa S, Hamdy M, and Mokhtar N.** Emerging role of p53, bcl-2 and telomerase activity in egyptian breast cancer patients. *IUBMB Life* 56: 483-490, 2004.

160. **Swiatoniowski G, Dabrowska M, Klaniewski T, and Molenda W.** Erb-2 overexpression in breast cancer. *Ginekol Pol* 74: 332-338, 2003.

161. **Takayama H, LaRochelle WJ, Sharp R, Otsuka T, Kriebel P, Anver M, Aaronson SA, and Merlino G.** Diverse tumorigenesis associated with aberrant . development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 701-706, 1997.

162. **Takeno S, Noguchi T, Fumoto S, Kimura Y, Shibata T, and Kawahara K.** E-cadherin expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma: promoter hypermethylation, Snail overexpression, and clinicopathologic implications. *Am J Clin Pathol* 122: 78-84, 2004.

163. **Tamagnone L and Comoglio PM.** Control of invasive growth by hepatocyte growth factor (HGF) and related scatter factors. *Cytokine Growth Factor Rev* 8: 129-142, 1997.

164. **Tanaka A, Arai K, Kitamura Y, and Matsuda H.** Matrix metalloproteinase-9 production, a newly identified function of mast cell progenitors, is downregulated by c-kit receptor activation. *Blood* 94: 2390-2395, 1999.

165. **Tjaderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, and Salo T.** Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res* 15: 55-58, 2001.

166. **Toth M, Gervasi DC, and Fridman R.** Phorbol ester-induced cell surface association of matrix metalloproteinase-9 in human MCF10A breast epithelial cells. *Cancer Res* 57: 3159-3167, 1997.
167. **Trudel D, Fradet Y, Meyer F, Harel F, and Tetu B.** Significance of MMP-2 expression in prostate cancer: an immunohistochemical study. *Cancer Res* 63: 8511-8515, 2003.
168. **Tuck AB, Park M, Sterns EE, Boag A, and Elliott BE.** Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 148: 225-232, 1996.
169. **Turksen K, Choi Y, and Fuchs E.** Transforming growth factor alpha induces collagen degradation and cell migration in differentiating human epidermal raft cultures. *Cell Regul* 2: 613-625, 1991.
170. **Uchiyama A, Essner R, Doi F, Nguyen T, Ramming KP, Nakamura T, Morton DL, and Hoon DS.** Interleukin 4 inhibits hepatocyte growth factor-induced invasion and migration of colon carcinomas. *J Cell Biochem* 62: 443-453, 1996.
171. **Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, Carter BS, Karthaus HF, Schaafsma HE, Debruyne FM, and Isaacs WB.** Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res* 52: 5104-5109, 1992.
172. **Vadnais J, Nault G, Daher Z, Amraei M, Dodier Y, Nabi IR, and Noel J.** Autocrine activation of the hepatocyte growth factor receptor/met tyrosine kinase induces tumor cell motility by regulating pseudopodial protrusion. *J Biol Chem* 277: 48342-48350, 2002.
173. **Vleminckx K, Vakaet L, Jr., Mareel M, Fiers W, and van Roy F.** Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66: 107-119, 1991.
174. **Walther MM, Kleiner DE, Lubensky IA, Pozzatti R, Nyguen T, Gnarr JR, Hurley K, Venzon D, Linehan WM, and Stetler-Stevenson WG.** Progelatinase A mRNA expression in cell lines derived from tumors in patients with metastatic renal cell carcinoma correlates inversely with survival. *Urology* 50: 295-301, 1997.

175. **Wang CS and Tetu B.** Stromelysin-3 expression by mammary tumor-associated fibroblasts under in vitro breast cancer cell induction. *Int J Cancer* 99: 792-799, 2002.
176. **Wang FQ, So J, Reierstad S, and Fishman DA.** Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase. *Int J Cancer*, 2004.
177. **Wang H and Keiser JA.** Hepatocyte growth factor enhances MMP activity in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 900-905, 2000.
178. **Werb Z, Hembry RM, Murphy G, and Aggeler J.** Commitment to expression of the metalloendopeptidases, collagenase and stromelysin: relationship of inducing events to changes in cytoskeletal architecture. *J Cell Biol* 102: 697-702, 1986.
179. **Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, and Underwood PA.** The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem* 271: 10079-10086, 1996.
180. **Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, and Goldberg GI.** SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 264: 17213-17221, 1989.
181. **Windsor LJ, Birkedal-Hansen H, Birkedal-Hansen B, and Engler JA.** An internal cysteine plays a role in the maintenance of the latency of human fibroblast collagenase. *Biochemistry* 30: 641-647, 1991.
182. **Yamamoto H, Horiuchi S, Adachi Y, Taniguchi H, Noshio K, Min Y, and Imai K.** Expression of ets-related transcriptional factor E1AF is associated with tumor progression and over-expression of matrilysin in human gastric cancer. *Carcinogenesis* 25: 325-332, 2004.
183. **Yang X, Staren ED, Howard JM, Iwamura T, Bartsch JE, and Appert HE.** Invasiveness and MMP expression in pancreatic carcinoma. *J Surg Res* 98: 33-39, 2001.
184. **Zongjian J LB, Julie V, Michael L, Josette and Ivan R.I.** Autocrine c-Met/HGF-R modulation of localized Rho/ROCK/p38MAP kinase signaling directs the formation of protrusive, blebbed pseudopodial domains. *Submitted to Exp Cell Res*, march 2005.

185. **Zornig M, Hueber A, Baum W, and Evan G.** Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1551: F1-37, 2001.
186. **Zucker S, Conner C, DiMassmo BI, Ende H, Drews M, Seiki M, and Bahou WF.** Thrombin induces the activation of progelatinase A in vascular endothelial cells. Physiologic regulation of angiogenesis. *J Biol Chem* 270: 23730-23738, 1995.